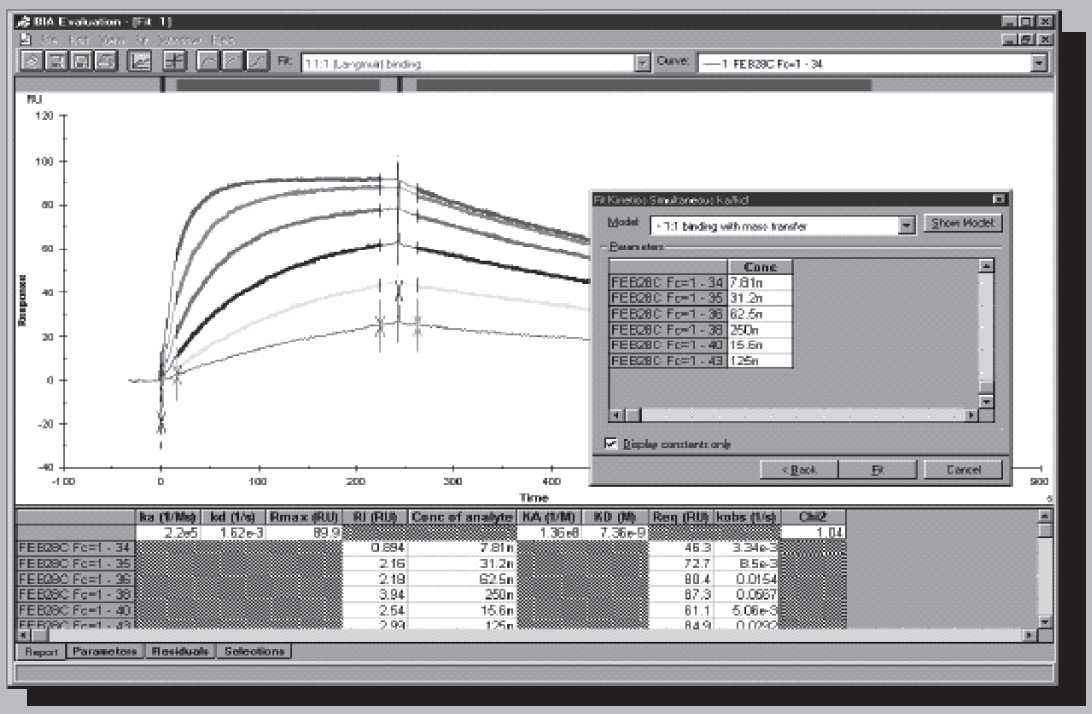
GE Healthcare

Biacore

BIAevaluation Biacore J

Software Handbook



日本語取扱説明書

GE imagination at work

71-3196-32

目 次

1. センサーグラムの編集 …… 1
1-1. ソフトウエアの起動 …… 1
1-2. ファイルの呼び出し …… 1
1-3. グラフ化 …… 3
1-4. センサーグラムの編集 …… 5
1-4-1. 不必要部分の削除 …… 5
1-4-2. ベースライン(Y 軸)のあわせ方 …… 6
1-4-3. インジェクション領域(X 軸)のあわせ方 …… 7
1-4-4. センサーグラムの基点移動 …… 10
1-4-5. センサーグラムの引き算 …… 13
1-5. その他 …… 15
1-5-1. グラフのタイトル …… 15
1-5-2. センサーグラムの凡例 …… 16
1-5-3. センサーグラムの色,その他表示の変更 …… 18
1-5-4. グラフの表示スケール …… 19

2. 反応速度定数の算出 …… 20
2-1. 解説 …… 20
2-1-1. 反応速度（Kinetics）と親和性（Affinity） …… 20
2-1-2. BIAevaluation による解析法 …… 21
2-2. 非線形解析 …… 22
2-2-1. 同時解析 （Global fitting による解析） …… 22
2-2-2. 同時解析 （Local fitting による解析） …… 27
2-3. 分割解析 …… 29
2-4. 線形解析 …… 34

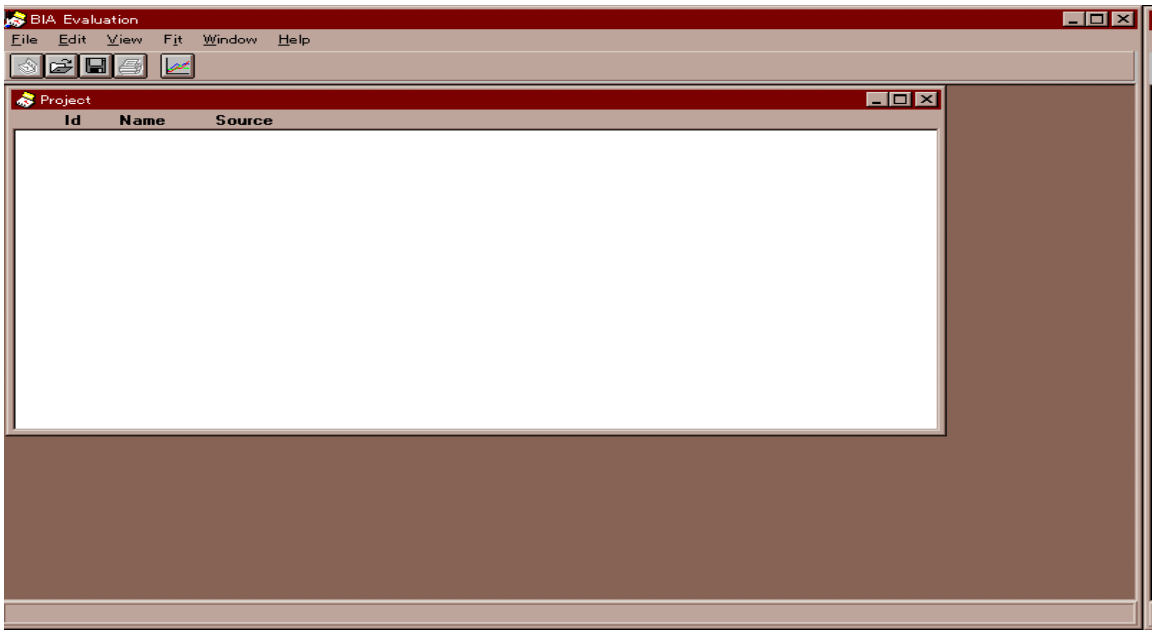
3. 平衡値からの解離定数の算出（平衡値解析） …… 39

4. 濃度測定 …… 45
4-1. ファイルの呼び出し …… 46
4-2. データの抽出 …… 46
4-3. 測定濃度の入力 …… 48
4-4. 検量線の作成 …… 48
4-5. 濃度の算出 …… 49

1.センサーグラムの編集

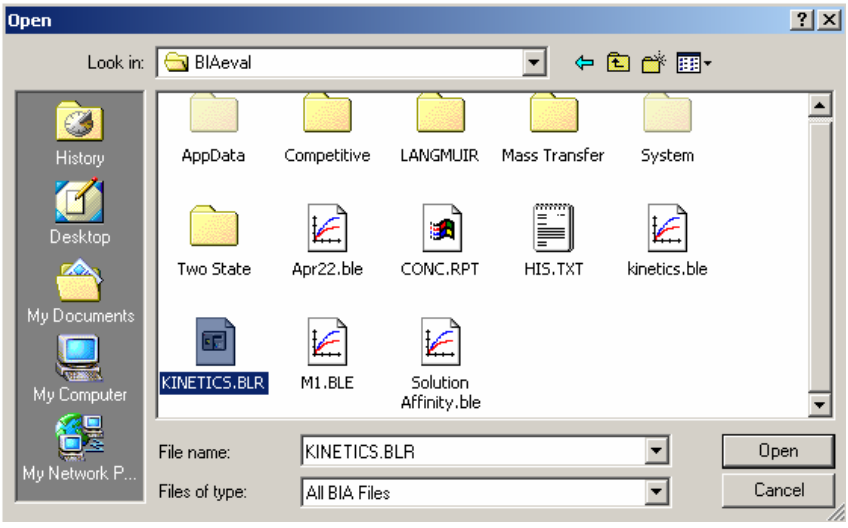
1-1. ソフトウエアの起動

画面左下の **Start** → **BIA Programs** → **BIAevaluation for Biacore J** をクリックする。



1-2. ファイルの呼び出し

アイコン（ ）をクリックし、目的のファイルを選択する。
ここでは、C:/Program Files/Biaeval/Kinetics を選択する。



Open をクリックする。

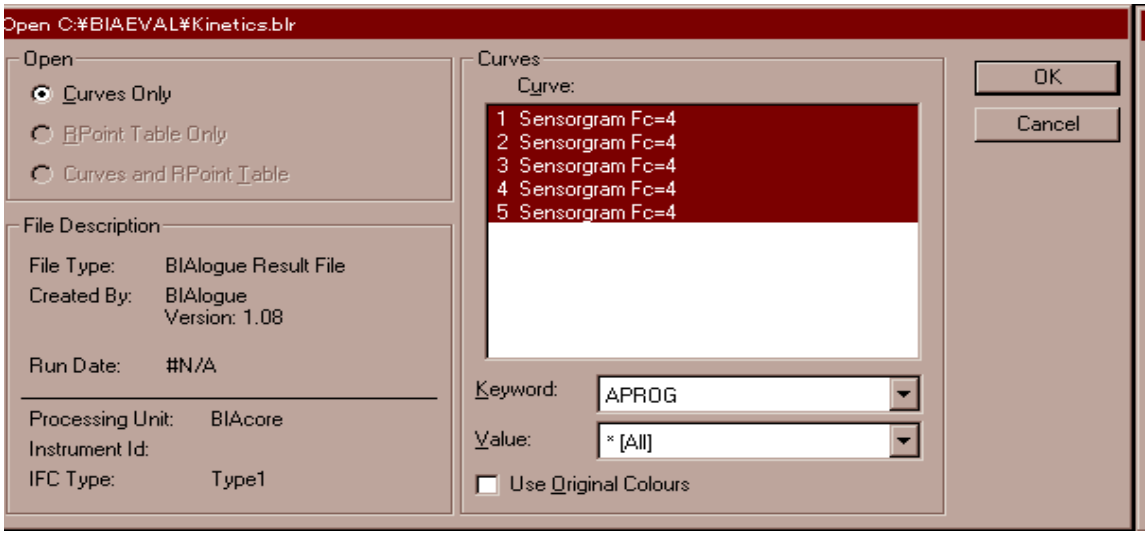
ファイルの種類とアイコンについて

ファイルの種類によってアイコンが異なる。

(1)　Biacore コントロールソフトウエアで保存したファイル（Raw data）

(2)　BIAevaluation ソフトウエアで保存したファイル

(3)　テキストファイル



注意

Use Original Coloursをチェックすると、Biacore control softwareと同様に、各フローセルがオリジナル色で表示される。

(Biacore J)

フローセル 1　　・・・・・・赤

フローセル 2　　・・・・・・緑

フローセル 1−2 ・・・・・・黒

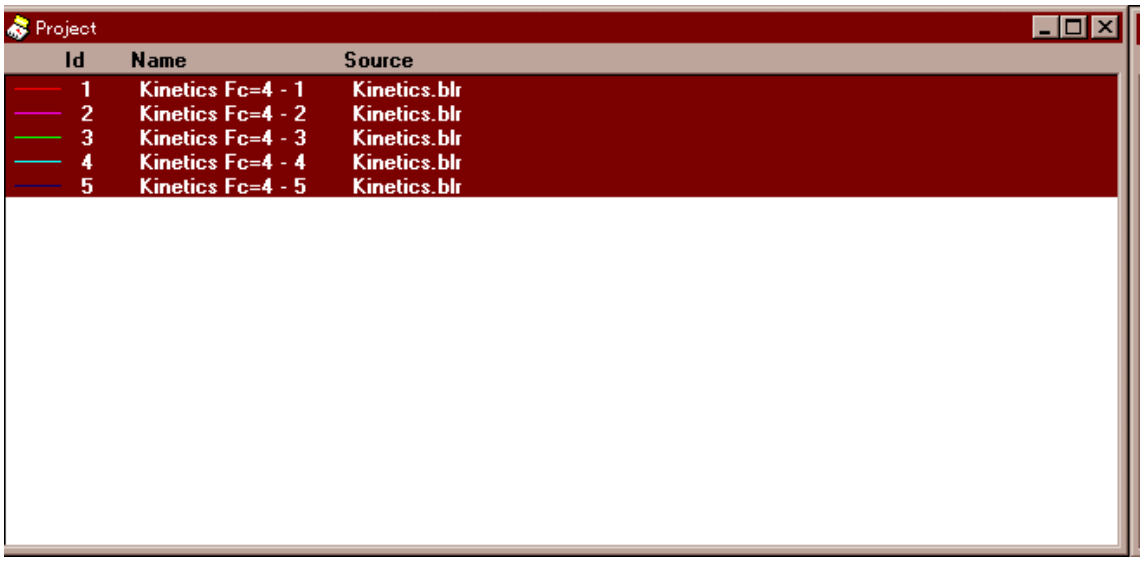
フローセル 2−1 ・・・・・・黒

Use Original Colours は、目的によって選択する。

OK をクリックする。

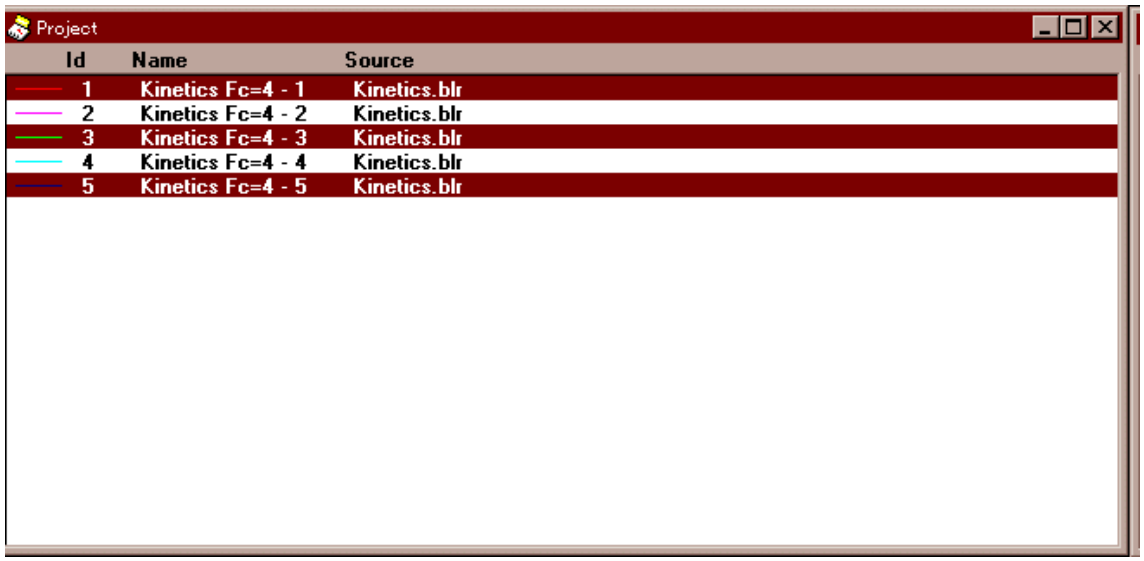
1-3. グラフ化

はじめの状態では全カーブが選択されている。

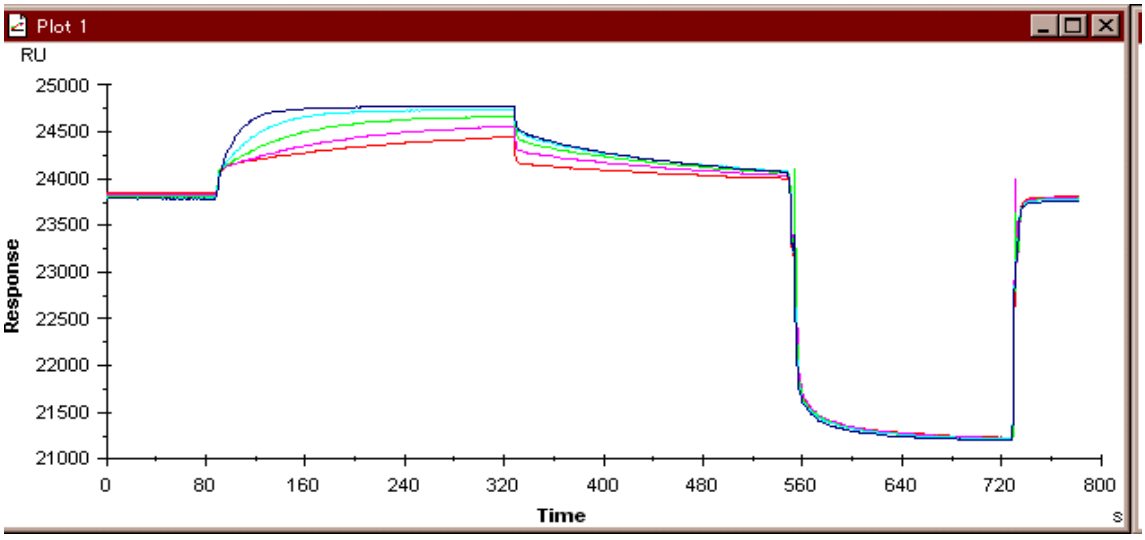


目的のカーブのみをグラフ化したい場合には、カーソルを目的のカーブに移動後、クリックする。連続しないカーブを選択したい場合には、コントロール・キー（Ctrl）を押しながらクリックする。連続して選択したい場合には、マウスのドラッグ操作で選択できる。また、一番上のカーブを選択し、シフト・キー（Shift）を押しながら、最後のカーブをクリックすると、全カーブが選択される。

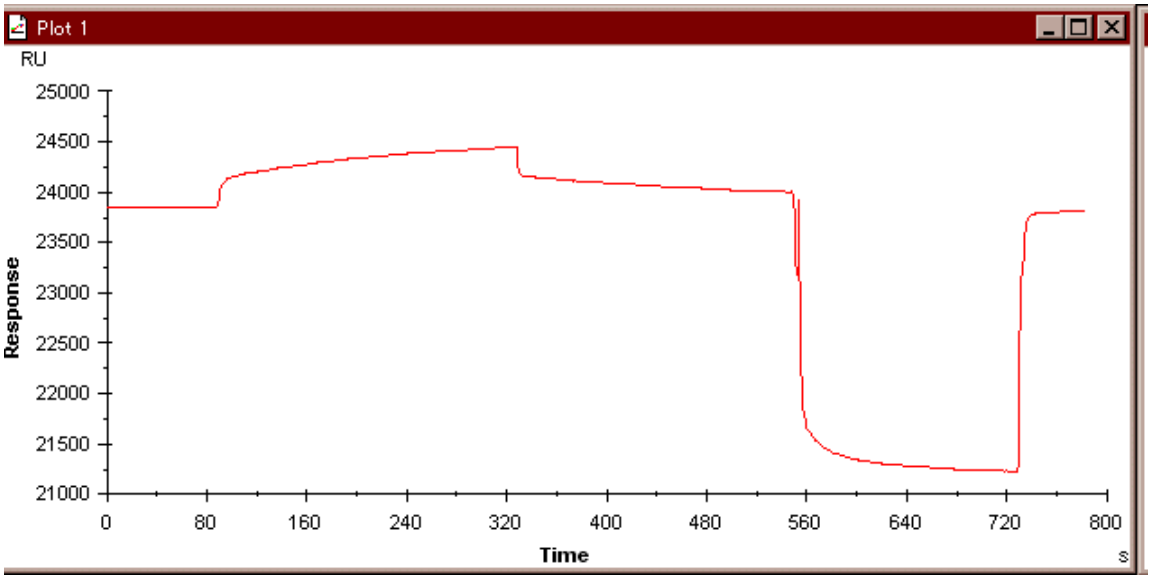
（例）



グラフ化したいカーブを選択後、アイコン（ ）をクリックする。



再度、アイコン（ ）をクリックすると、画面右上のカーブリストに表示されているカーブのみが、1 本表示される。



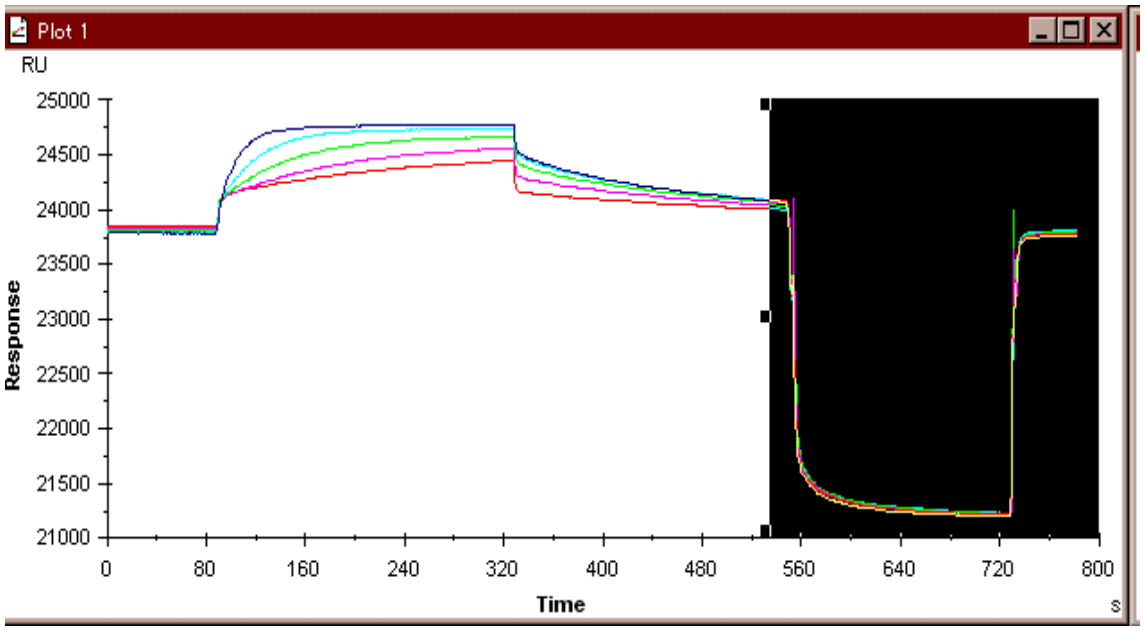
カーブリスト Curve

のカーブを変更すると、表示グラフを変更できる。

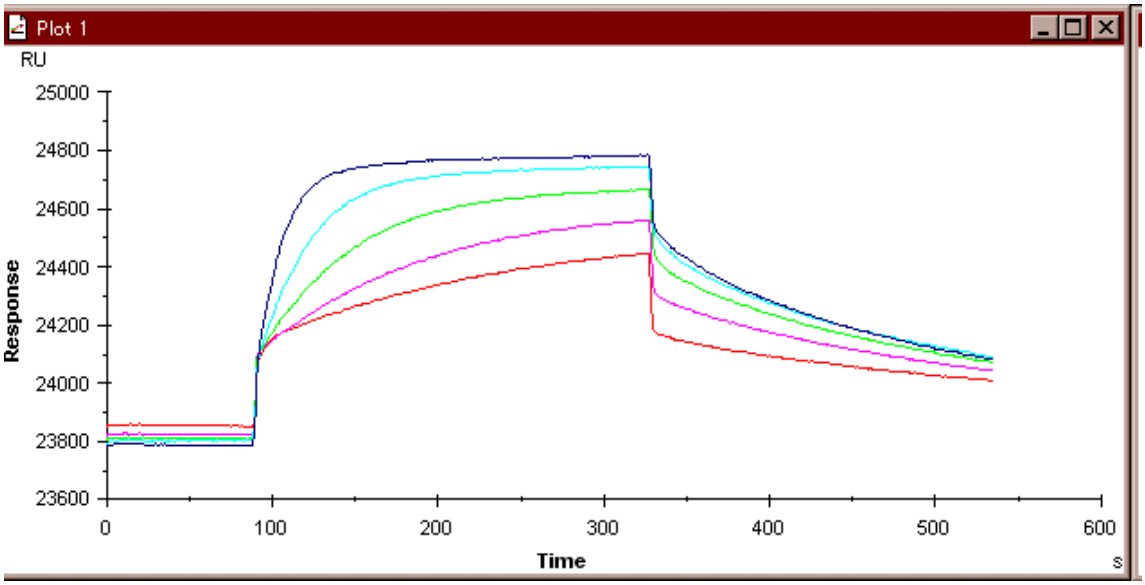
1-4. センサーグラムの編集

1-4-1. 不必要部分の削除

センサーグラム中の不必要な部分（再生領域など）を削除する。マウスの右のボタンをドラッグし、削除する範囲を設定する。

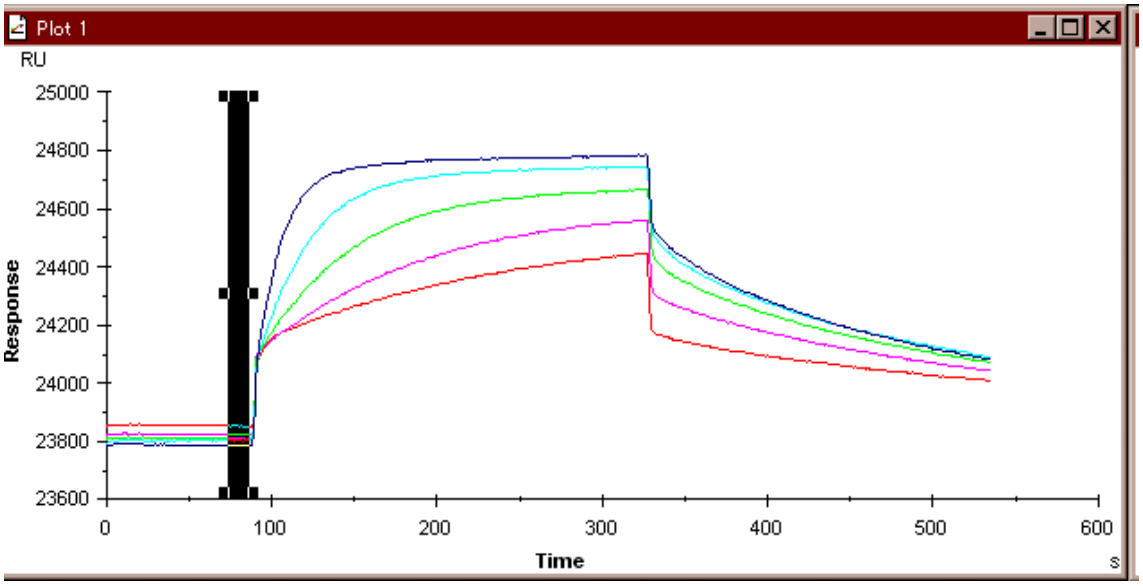


Edit → Cut をクリックする（キーボードのコントロール・キーを押しながらXキーを押しても削除できる）。

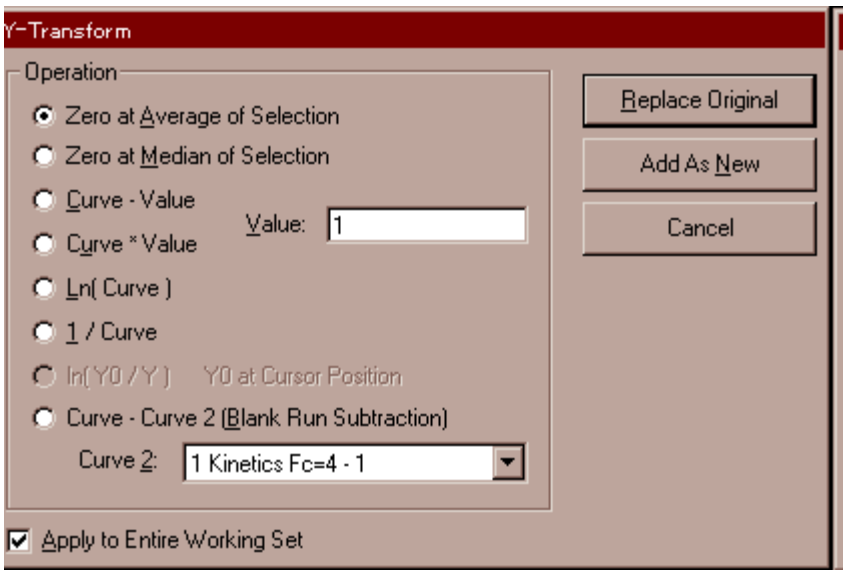


1-4-2. ベースライン(Y 軸)のあわせ方

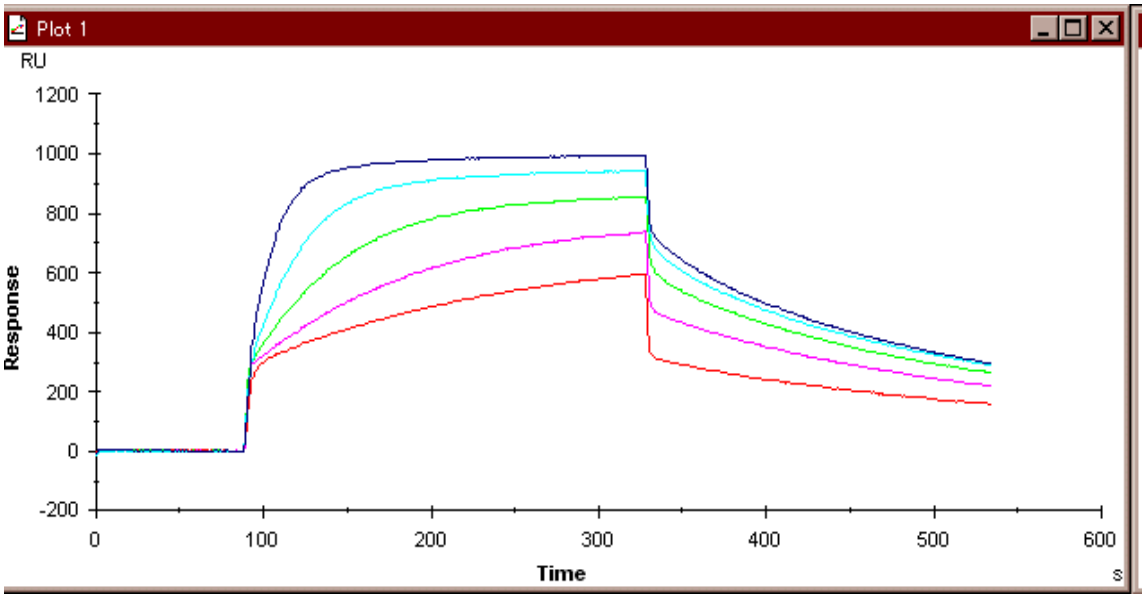
マウスの右ボタンを使用し、ベースラインをあわせる範囲をドラッグする。



アイコン（ ）あるいは **Calculate → Y -Transform...**をクリックする。

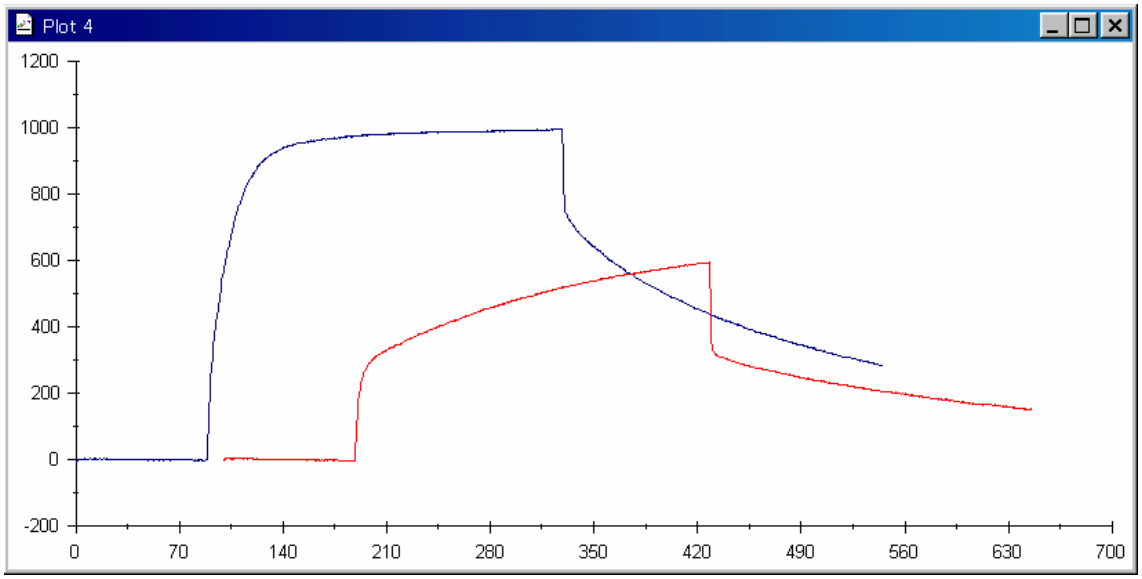


一番上の ○ **Zero at Average of Selection**を選択し、**Replace Original**をクリックする。



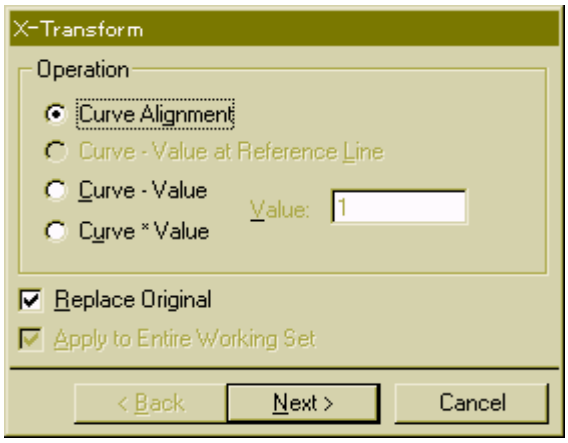
1-4-3. インジェクション領域(X 軸)のあわせ方

データを重ね書きした場合、インジェクション領域の位置が異なる。

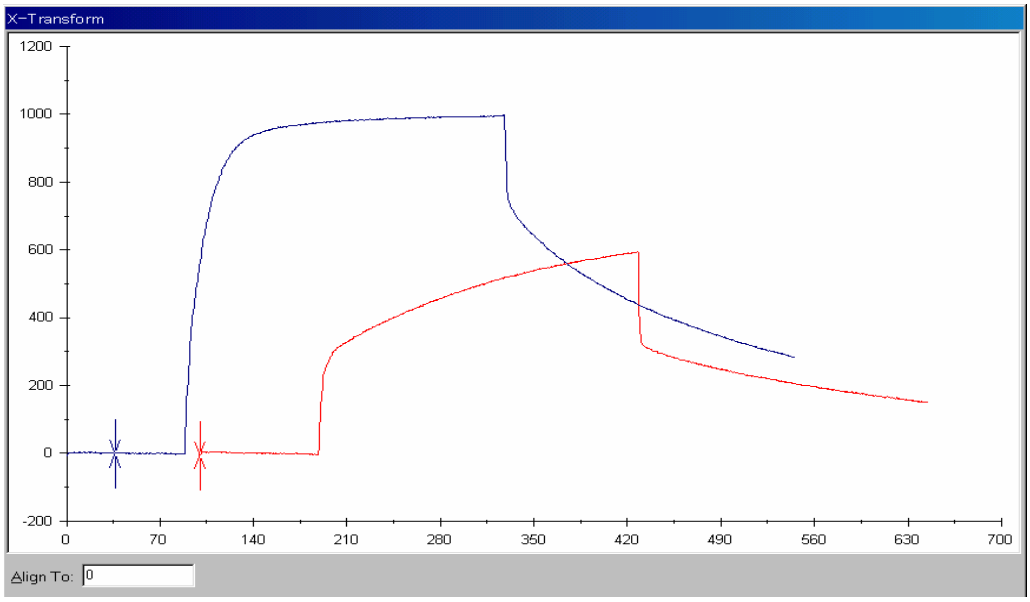


インジェクション領域を合わせるため、センサーグラムを X 軸方向に移動させる。

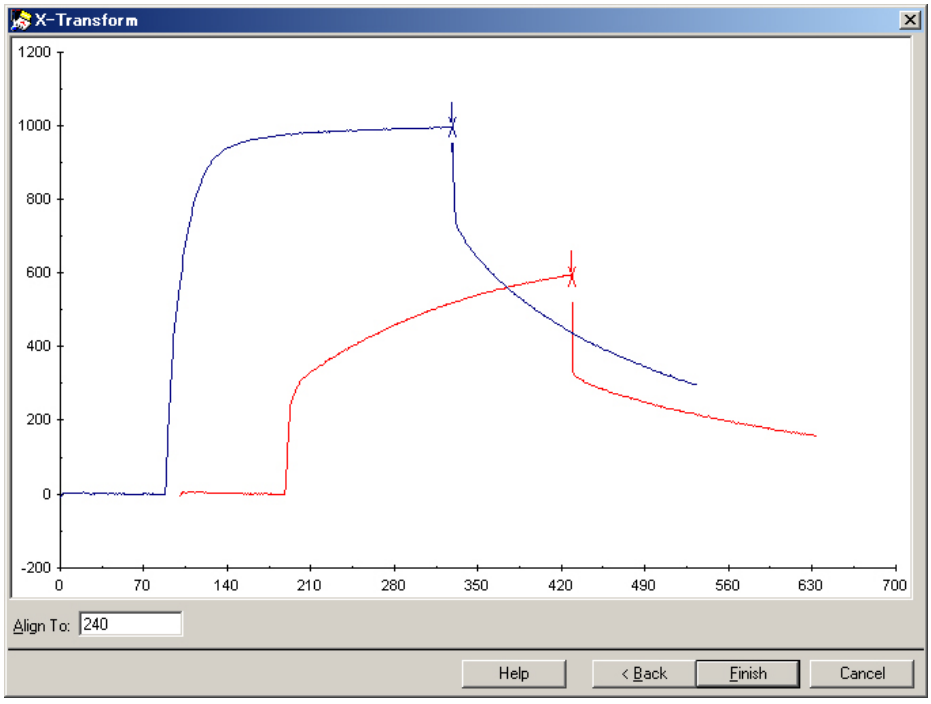
アイコン（ ）をクリックする。



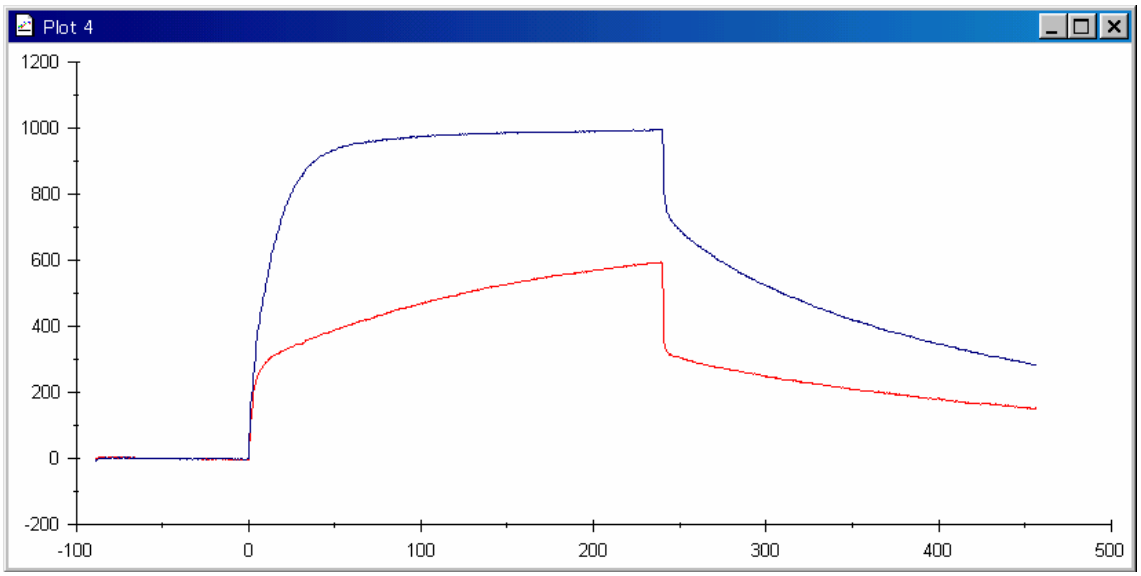
一番上の ○ **Curve Alignment**を選択し、**Next>**をクリックする。



センサーグラム上に、各センサーグラムと同色のバーが表示される。
バーを各センサーグラム上のインジェクション終了ポイントにそれぞれ移動する。
正確にインジェクション終了ポイントを合わせたい場合は、インジェクション終了ポイント付近をマウスの左ボタンをドラッグし拡大表示して合わせる。



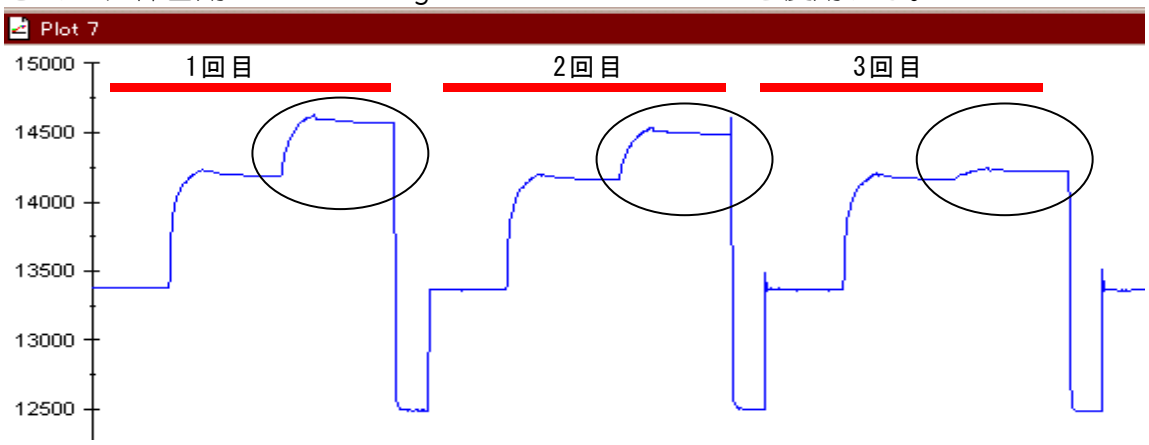
すべてのセンサーグラムについてインジェクション終了ポイントを移動後、ウインドウ左下の**Align To:**ボックスへアナライト添加時間を入力して、**Finish**をクリックする。



X 軸方向の位置が一致する。

1-4-4. センサーグラムの基点移動

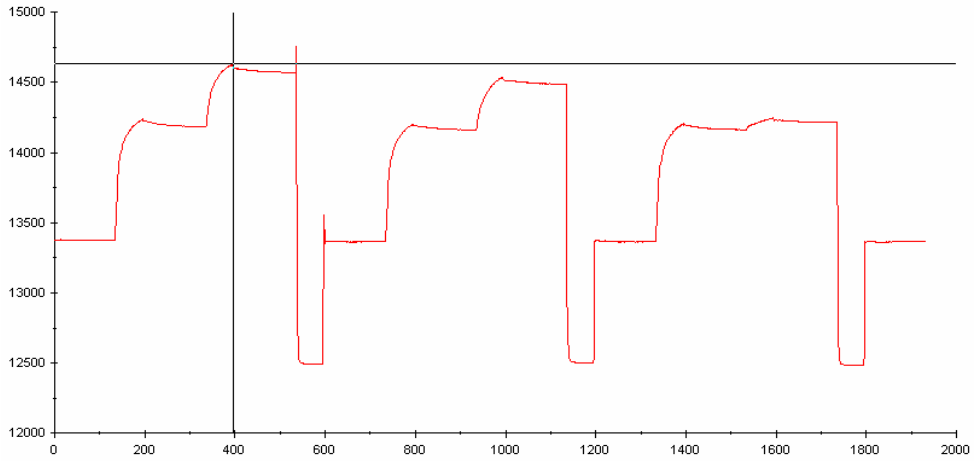
複数のセンサーグラムについて、測定サイクルを変えず、一連のセンサーグラムの中で繰り返し実験を行った場合には、下記のようなデータが得られる。ここでは、練習用データ C:/Program files/Biaeval/ His を使用する。



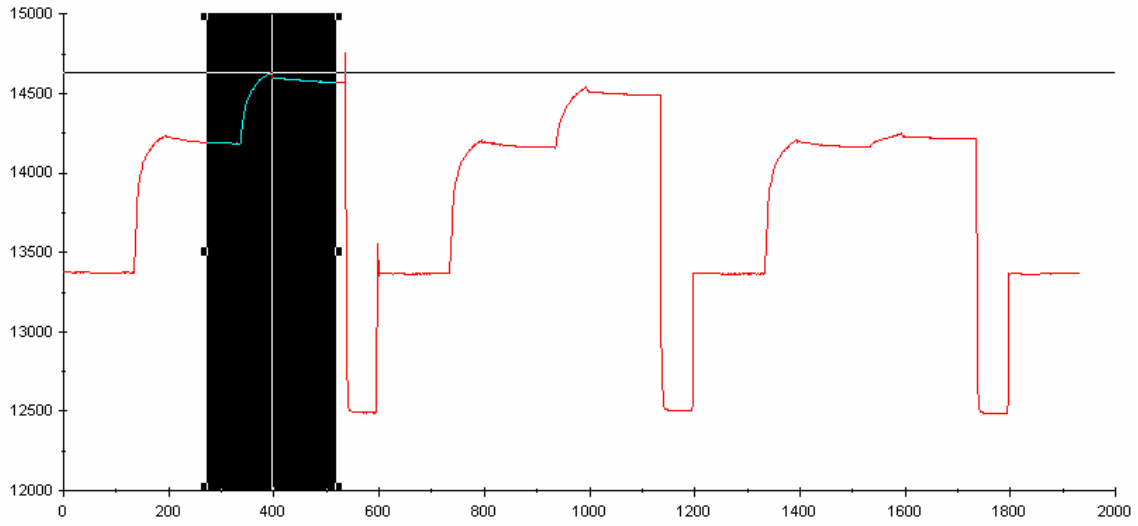
この実験は、リガンドをキャプチャー法にてセンサーチップ表面にトラップさせ、相互作用測定を行う実験で得られるセンサーグラムの一例である。溶液の添加は、リガンド→アナライト→再生溶液の順で、その一連の実験について、3段階濃度のアナライトに対し、連続測定したものである。

3 つの重ね書きしたい部分をコピー・ペーストして 3 枚のセンサーグラムに分けて、重ね書きをする。

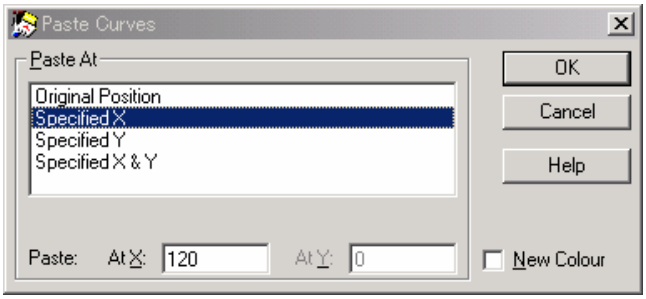
1 つ目の部分をコピー・ペーストする。**リファレンスライン**（ ）を呼び出し、**インジェクション終了ポイント**にあわせる。



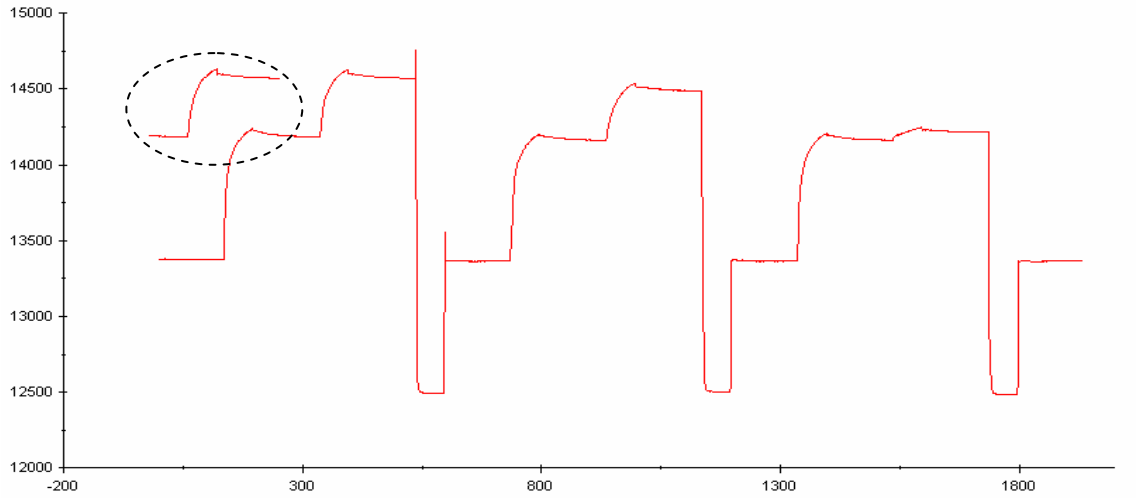
コピーしたい**リファレンスラインを含む**範囲をマウス**右**ボタンでドラッグする。



Edit → **Copy**（注意；**Copy Graph** ではない）をクリックする。
Edit → **Paste Curve** をクリックする。



Specified　X を選択し、**At X:**ボックスへアナライト添加時間を入力して、**OK** をクリックする。



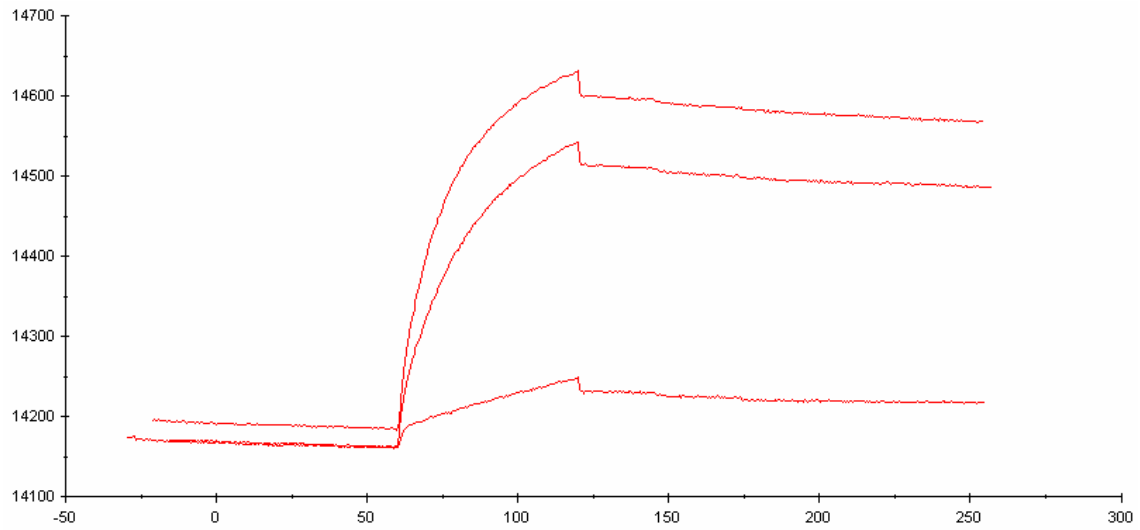
選択された範囲でペーストされる。ペーストしたセンサーグラムは自動保存されている。

File → Close をクリックする。

プロジェクト（**Window → Project**）画面に戻ると、ペーストしたセンサーグラムが 1 個追加されている。

もう一度 （—— 1 his.txt 1 His.txt ）を選択し、 をクリックして最初の連続したセンサーグラムを表示した後、2 個目、3 個目のセンサーグラムに関しても同様にコピー・ペーストしていく。

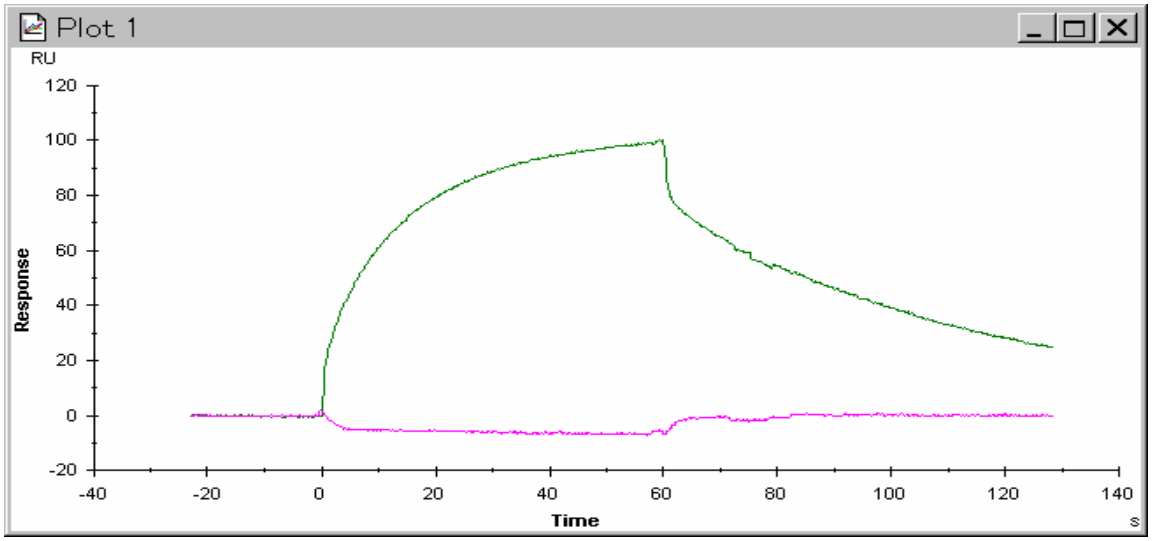
ペーストした新しいカーブを 3 本選択し、重ね書きする。さらに、必要があれば、ベースラインをあわせ、不要な部分を削除する。



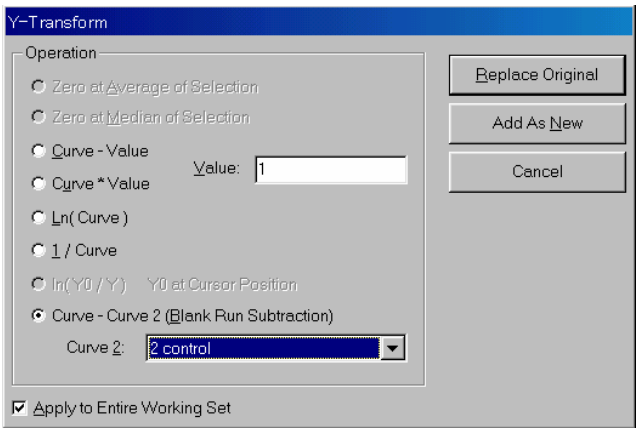
1-4-5. センサーグラムの引き算

引き算をしたいセンサーグラムは、予めインジェクション・ポイントを揃えておく。目的のファイルを呼び出し、表示させる。

このグラフは、相互作用のセンサーグラム（—— 1　sample 1 ）とコントロール 0 濃度のセンサーグラム（—— 2　control ）との重ね書きである。センサーグラム 1 から 2 を差し引きする。
まず、1,2 のカーブを重ね書きする。

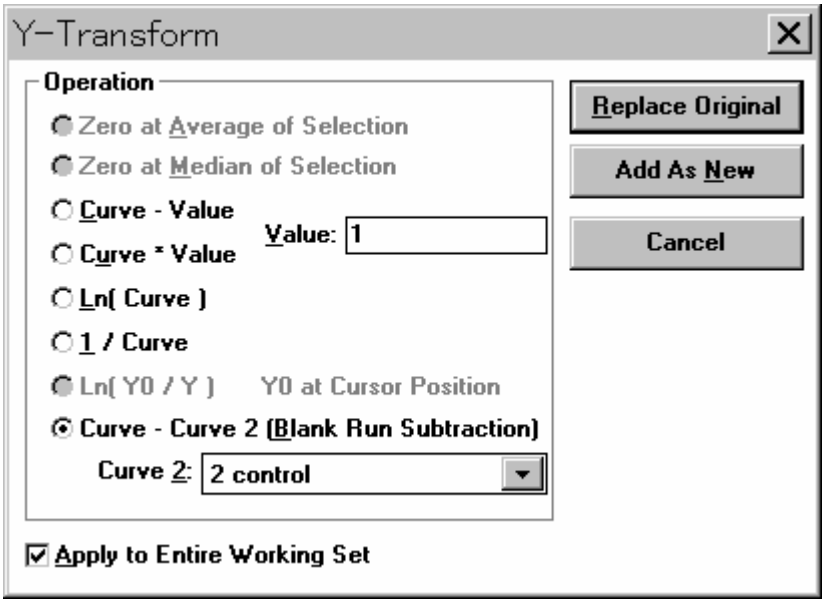


アイコン（ ）をクリックし、〇 **Curve - Curve 2 (Blank Run Subtraction)**を選択する。

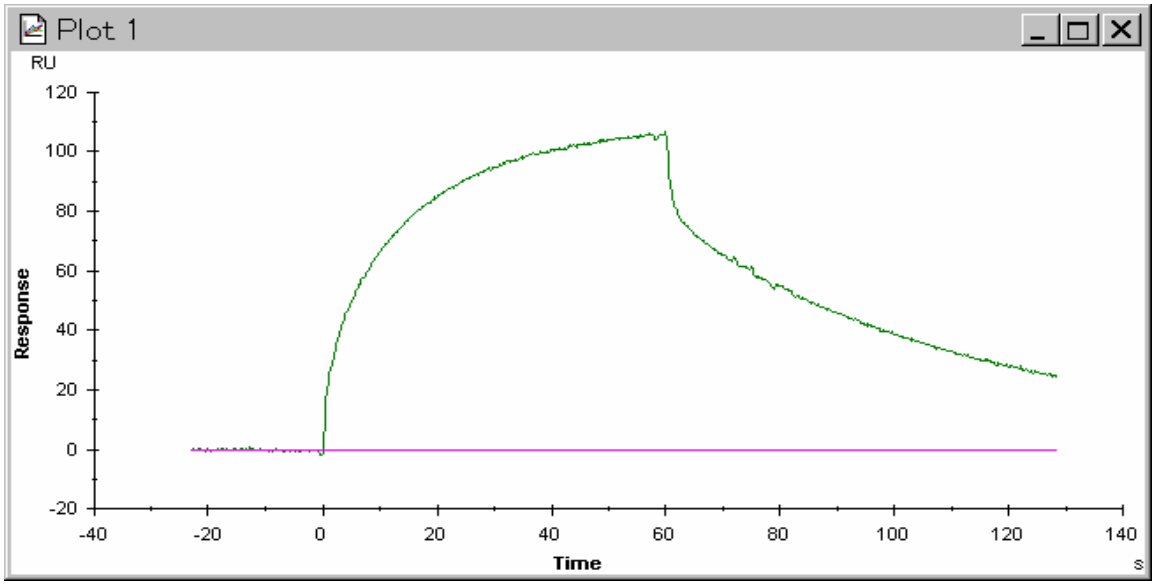


Curve 2 の▼をクリックし、Curve 2 に相当するデータを選択する（この場合は 2 control）。

↓



Replace Original（表示しているグラフに上書き）あるいは **Add As New**（新しいグラフを作成）をクリックする。

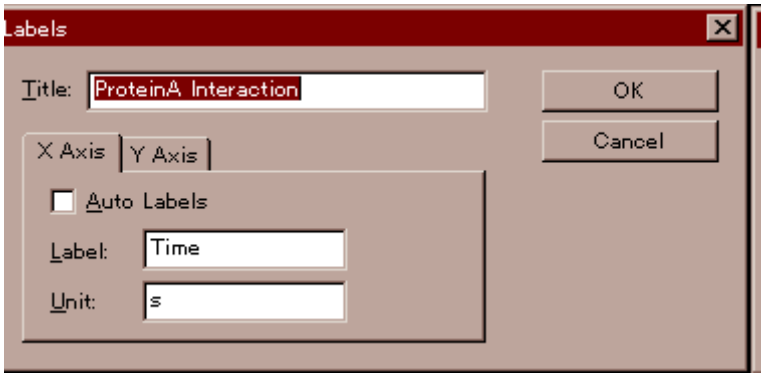


引き算されたセンサーグラムが表示される。

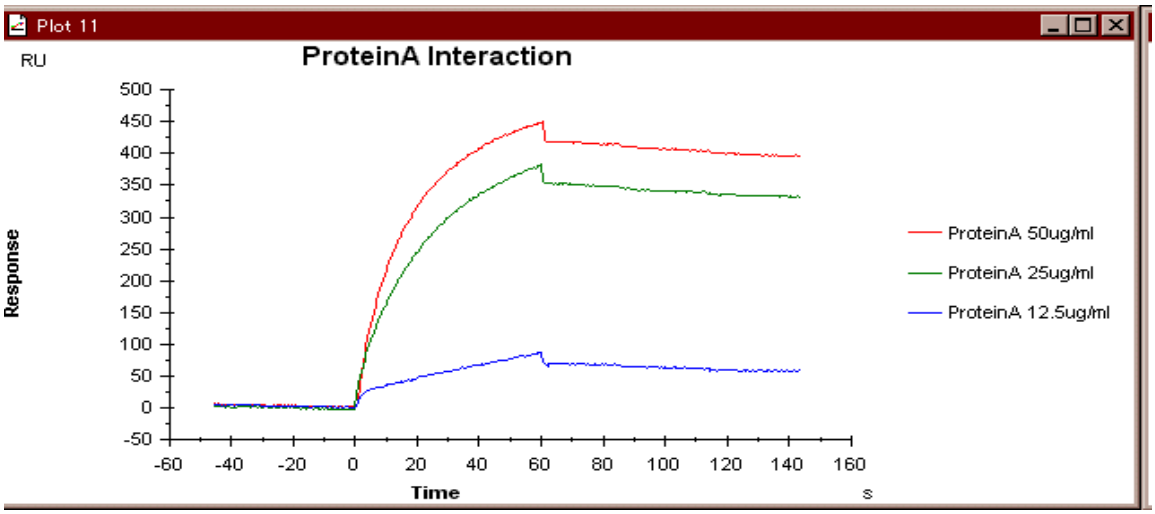
1-5. その他

1-5-1. グラフのタイトル

View → Labelsをクリックする。任意のタイトルを入力し、**OK**をクリックする。

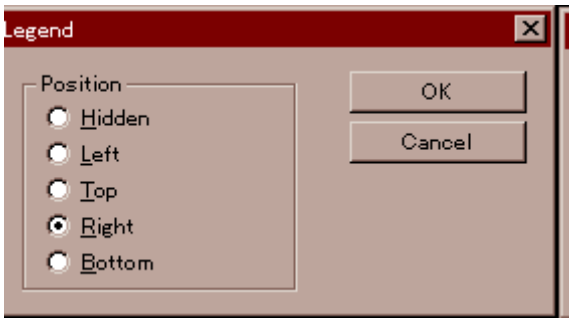


グラフ中の X 軸,Y 軸の表示を変更したい場合も、この **Labels** ボックス中で操作できる。☐ **Auto Labels** のチェックを外し、必要事項を入力する。

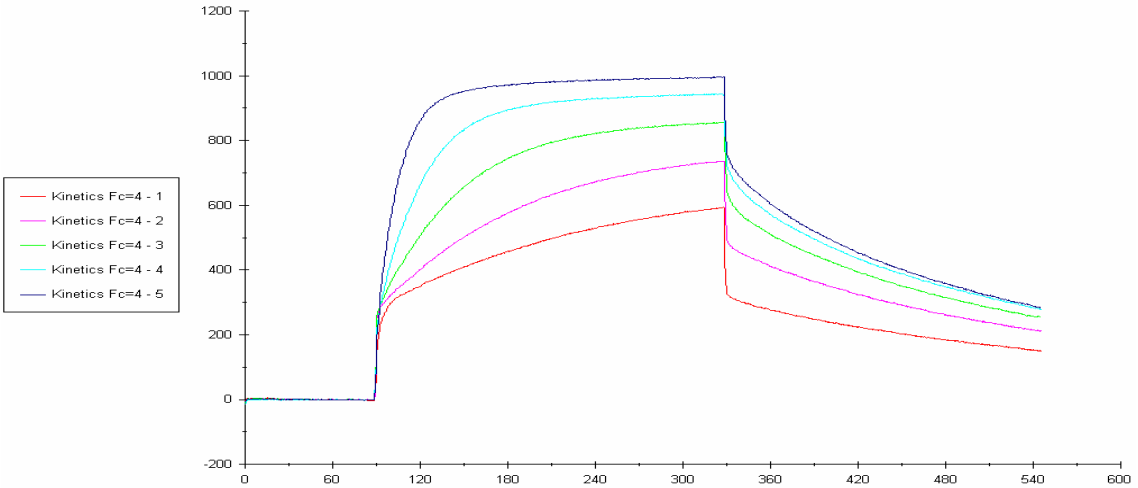


1-5-2. センサーグラムの凡例

View → Legend をクリックする。凡例表を示したいグラフ中の位置を選択し、**OK** をクリックする。

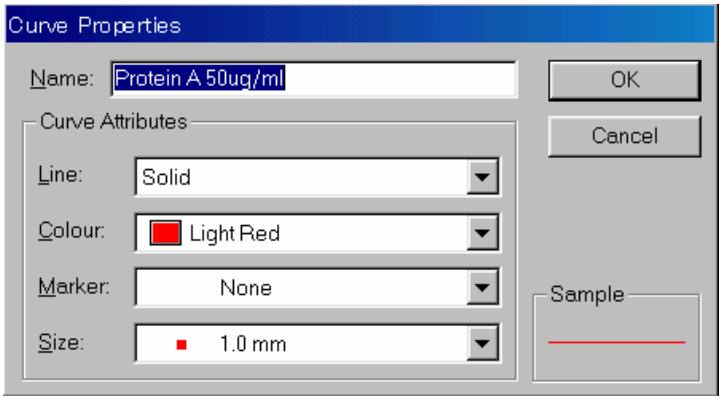


Hidden	凡例を表示しない
Left	グラフの**左**に表示
Top	グラフの**上**に表示
Right	グラフの**右**に表示
Bottom	グラフの**下**に表示

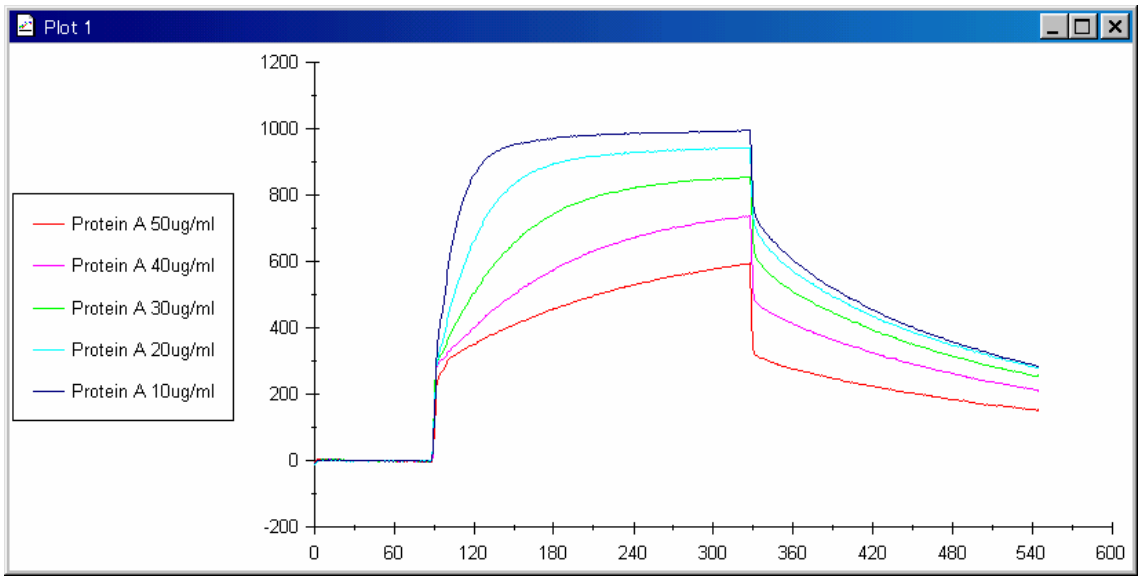


ここで表示されるのは Project で示されているセンサーグラムの名前が表示される。

凡例の表示を変更する場合は、センサーグラム上でダブルクリックし、**Curve Properties** を表示させる。**Name:**　中に凡例として表示したい内容を記載し、**OK** をクリックする。



必要なセンサーグラムの名前をすべて変更し、**OK** をクリックする。

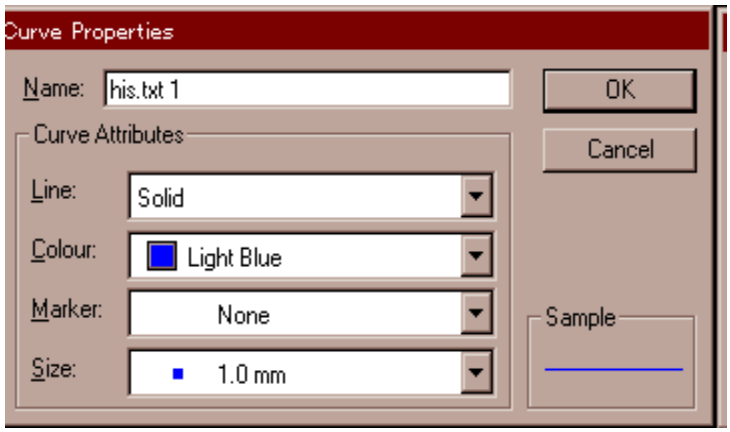


1-5-3. センサーグラムの色,その他表示の変更

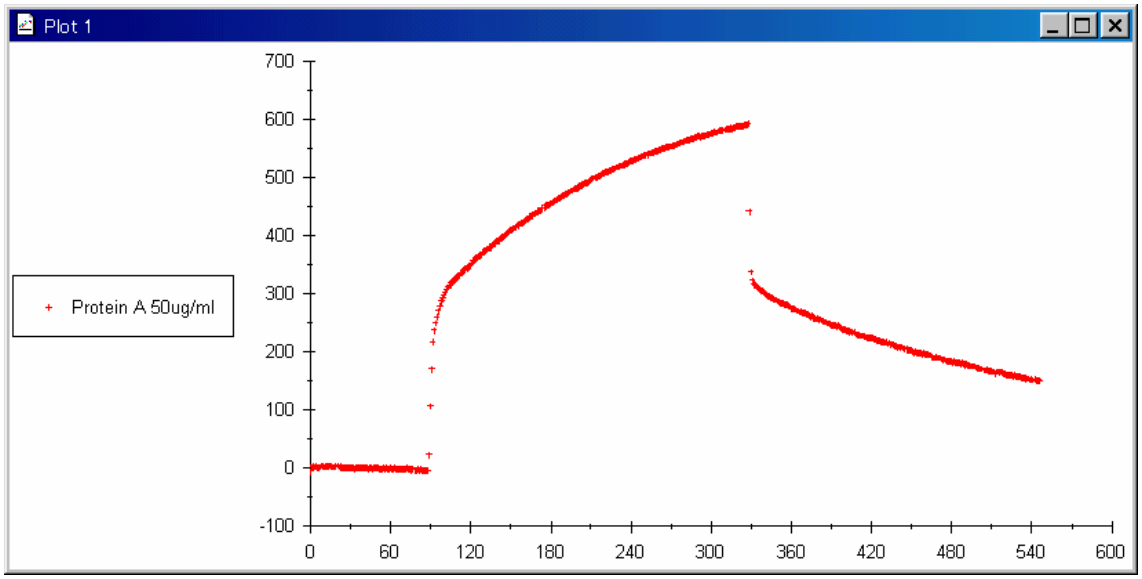
センサーグラム上をダブルクリックし、**Curve Properties** を表示させる。 **Colour:**

の▼をクリックし、カラーを変更し、**OK** をクリックする。

その他、センサーグラムの名前、線の有無、色、マーカーの有無およびそのサイズをここで変更できる。

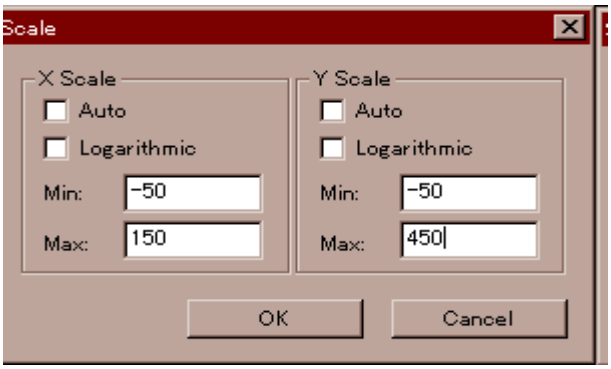


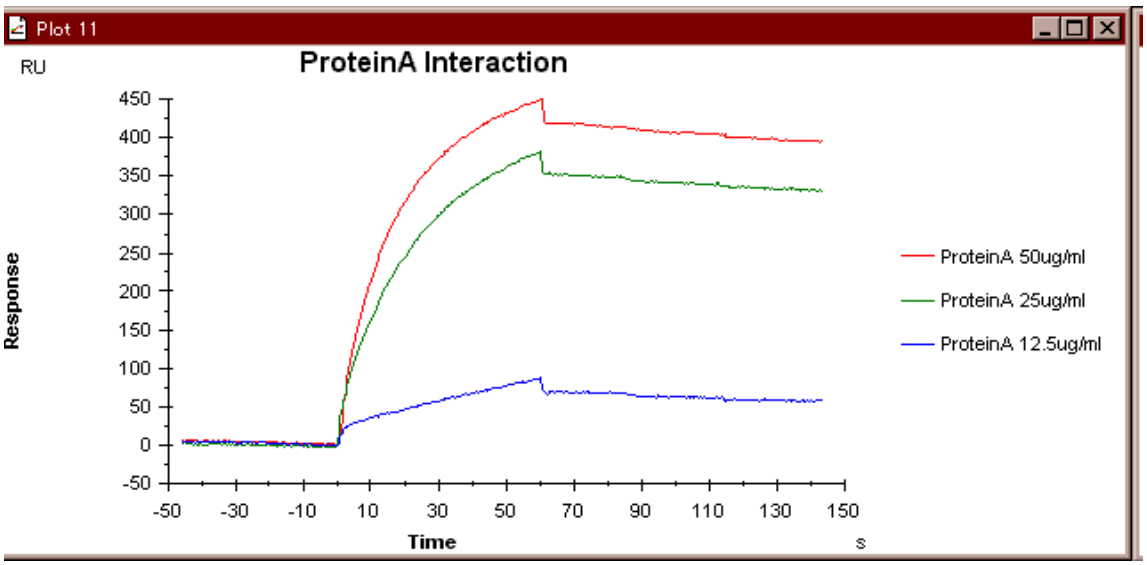
(**Marker** 変更例)



1-5-4. グラフの表示スケール

View → **Scale** をクリックする。□Auto 中のチェックを外し、X 軸,Y 軸のスケールを入力し、**OK** をクリックする。





2.反応速度定数の算出

2-1. 解説

2-1-1. 反応速度（Kinetics）と親和性（Affinity）

分子同士が相互作用する時には、両者には何らかのAffinityがあることを意味する。Affinityは、結合の強さを表す尺度として一般的に使用されており、結合定数（K_A、単位M^{-1}）あるいは解離定数（K_D、単位M）として、記述される。例えば、A+B⇔AB反応の平衡状態において、解離定数(K_D)は、K_D = ［A］［B］/［AB］と定義される（結合定数K_A=1/K_D）。この数値が低いほどAffinityは強いことになる。Affinityの大小は、結合の速さおよび解離の速さによって決定される。つまり、速い結合および遅い解離の結合ほどAffinityは強くなり、遅い結合および速い解離の結合ほどAffinityは弱くなる。
反応速度に関するパラメータ（kinetics parameter）は、結合速度定数（k_a、単位$M^{-1}s^{-1}$）解離速度定数（k_d、単位s^{-1}）として表現される。

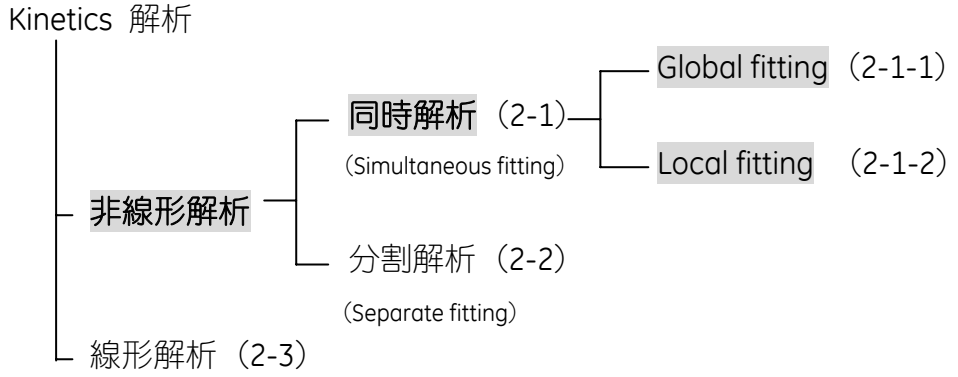
$$A + B \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} AB$$

$K_D = k_d/k_a$　　$K_A = k_a/k_d$

この章では、反応速度定数（kinetics parameter）の算出について説明する。

2-1-2. BIAevaluation による 解析法

Biacore での反応速度定数算出法は、得られたセンサーグラムから直線性のある変換式に変換し、線形最小二乗法により解析する線形解析法とセンサーグラムを非線形最小二乗法により直接カーブフィッティングさせ、解析する非線形解析法がある。BIAevaluation では、上記の線形解析法および非線形解析法の両方を用いて解析が可能である。



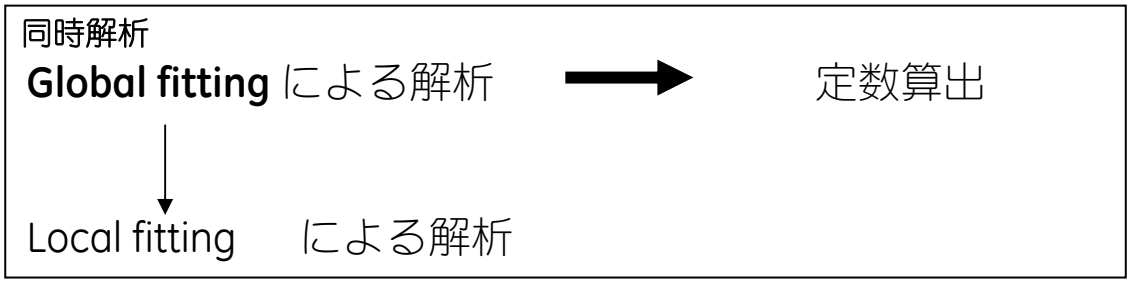
非線形解析法は、結合領域と解離領域のグラフに対し、同時にカーブフィッティングする**同時解析（Simultaneous fitting）**と各領域におけるグラフで別々にカーブフィッティングする**分割解析（Separate fitting）**に分けることができる。
分割解析では、まず、解離領域のセンサーグラムについてカーブフィッティングし解離速度定数k_dを算出し、さらに結合領域のセンサーグラムについてカーブフィッティングし、結合速度定数k_aを算出する。一方、**同時解析**では、センサーグラム全体をカーブフィッティングさせ、結合速度定数k_aと解離速度定数k_dを同時に算出する。

BIAevaluation では同時解析が基本となる。

同時解析法はさらに Global fitting と Local fitting の 2 通りに分けられる。
Local fittingでは、アナライト 1 濃度のセンサーグラムに対して 1 組の反応速度定数（結合速度定数k_aと解離速度定数k_d）を算出する。5 段階濃度で測定を行ったセンサーグラムの重ね書きからは、5 個のパラメータが算出される。一方、Global fittingでは、アナライトの全濃度にわたって同時にフィッティングを行い、全体を通して 1 組の反応速度定数を算出する。Global fittingでは、単純な濃度入力ミスやリガンドの失活等がある場合においても、全濃度にわたって共通の定数として解析するため、まったく誤った解析結果が得られてしまう可能性があるので注意が必要である。
これらのことから、Global fitting と Local fitting を組み合わせて解析するのが望ましい。

2-1-3. 解析の手順

BIAevaluation では各種の解析方法が可能であるが、基本的には以下の手順で解析を行うことを推奨する。



(手順)
① Global fitting により、反応速度定数を算出する。
② フィッティングが良好であれば、算出結果を採用する。
フィッティングが良好でない場合、もしくは各アナライト濃度においてフィッティングしたい場合は、Local fitting による解析を行う。

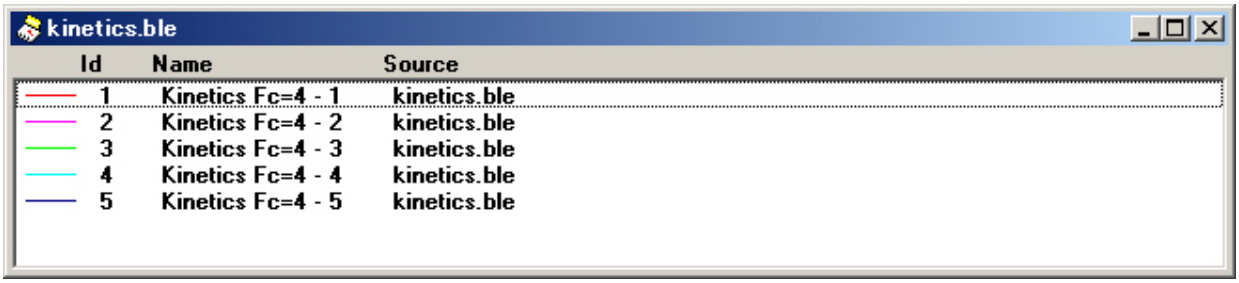
2-2. 非線形解析

2-2-1. 同時解析　（Global fitting による解析）

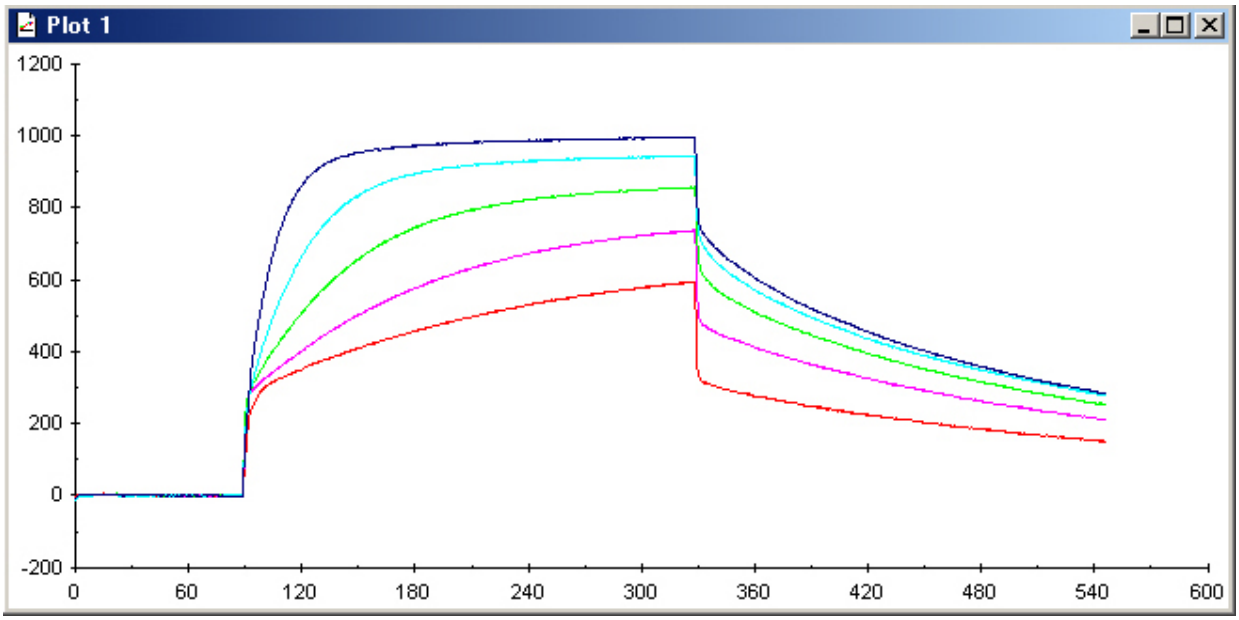
①センサーグラムの重ね書き（1 章参照）

ここでは、C:/Program files/Biaeval/kinetics.ble使用して説明する。

ファイルを呼び出す。



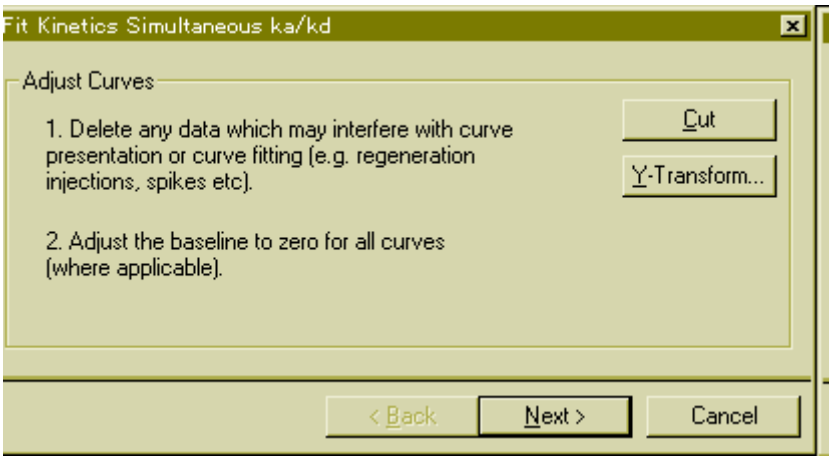
すべてのセンサーグラムを重ね書きする。



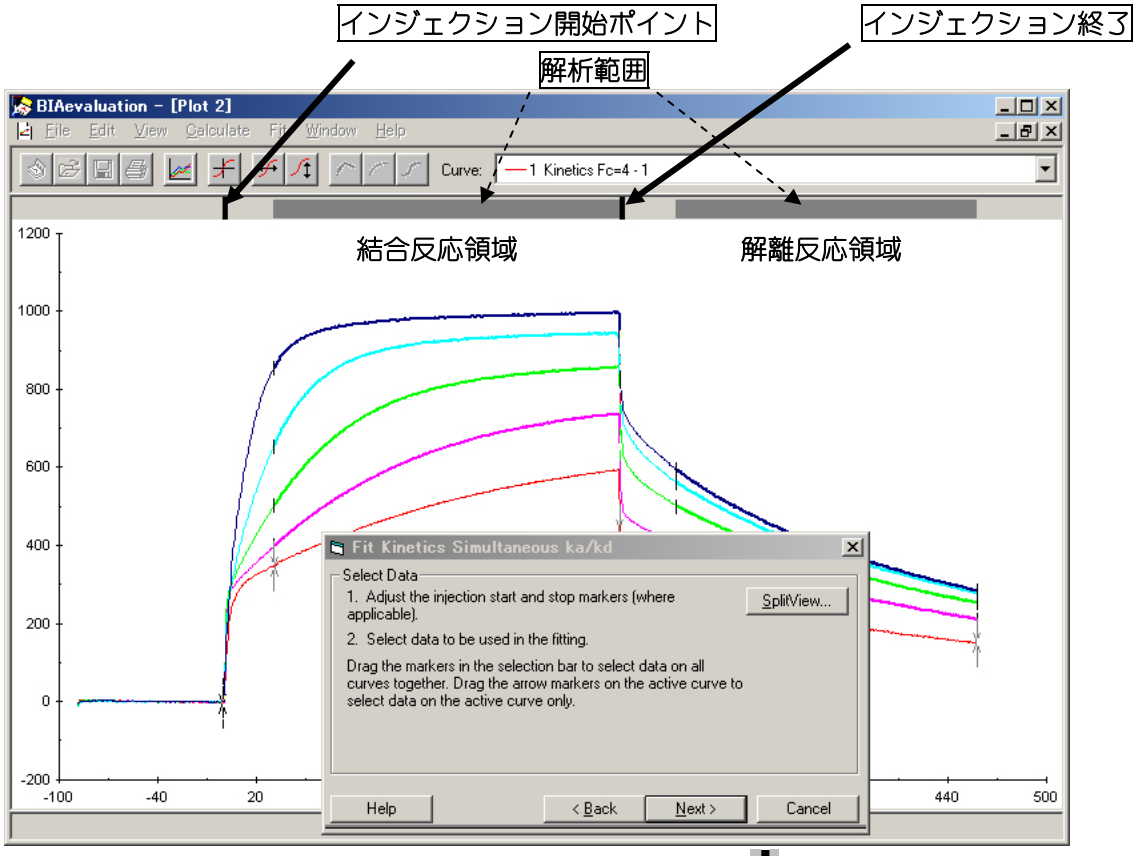
センサーグラムの編集（インジェクション領域およびベースライン合わせ、不必要部分の削除）は必ず行う。

②解析方法

アイコン（ ）あるいは **Fit → Kinetics Simultaneous ka/kd** をクリックする。

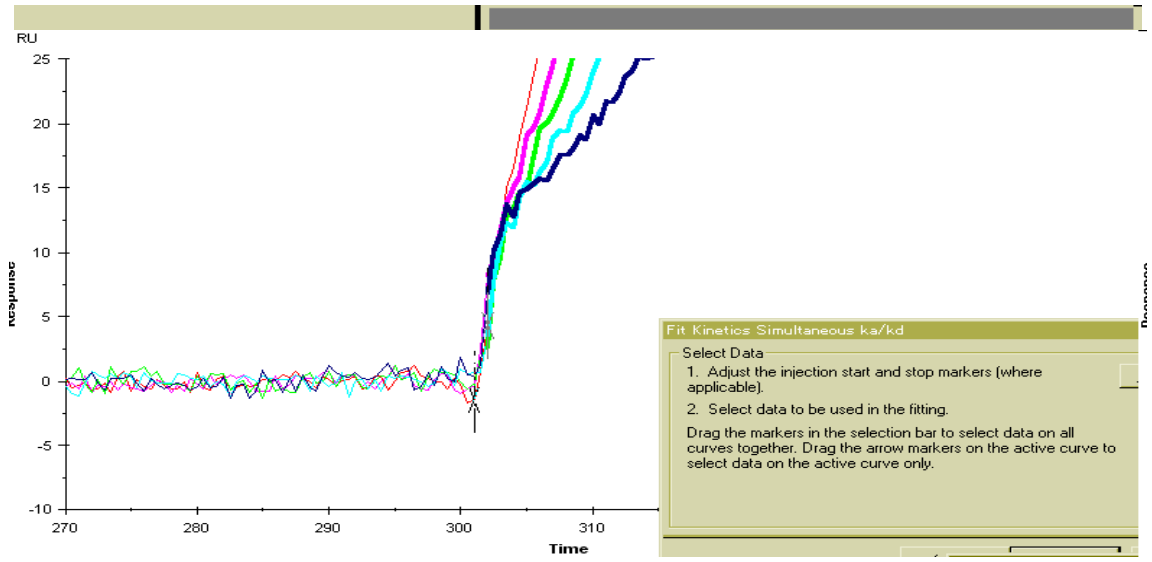


Next>をクリックする。

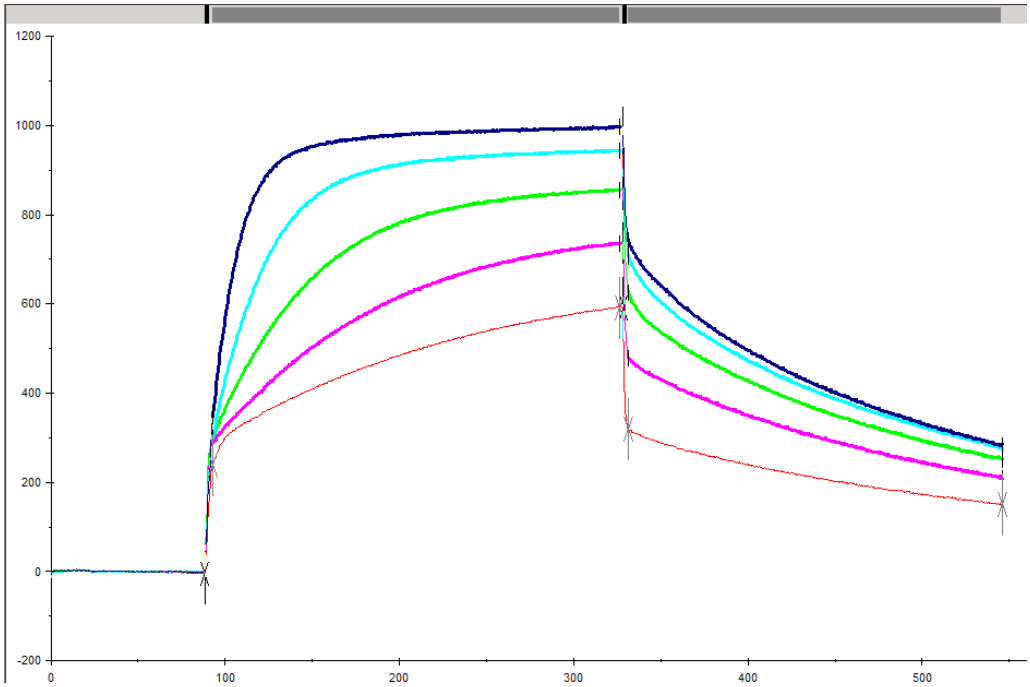


グラフ上部の選択バー中の<u>インジェクトポイントマーク（ ）</u>を移動させ、インジェクションの開始ポイントと終了ポイントにあわせる。

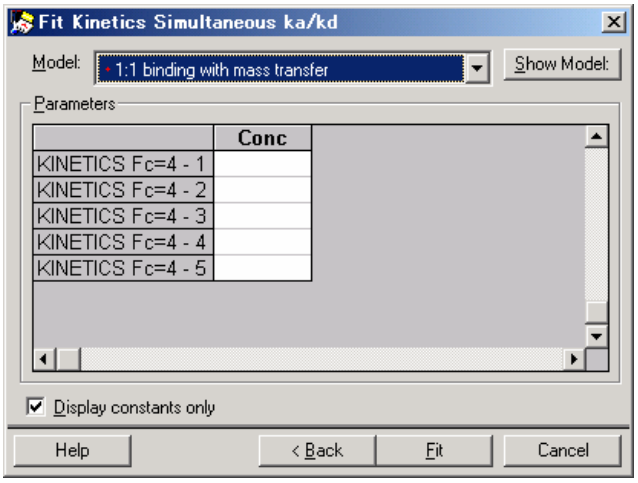
正確に合わせる場合は、インジェクション開始（終了）ポイント付近を拡大して合わせる。



次に、**解析範囲（　　）**の両端を左右に広げ、結合領域および解離領域の解析範囲を設定する（通常はインジェクションの開始直後および終了直後を避けて全体を設定する）。
グラフの拡大解除は、センサーグラム以外の部分をダブルクリックする。



設定後、**Next>**をクリックする。



反応モデル **1:1 binding with mass transfer** を選択する。

1:1 binding with mass transfer モデルについて

A + B ⇔ AB

リガンドの固定化量が多い場合に受けるマストランスポートリミテーション効果を加味した、リガンドアナライトの 1：1 反応モデル

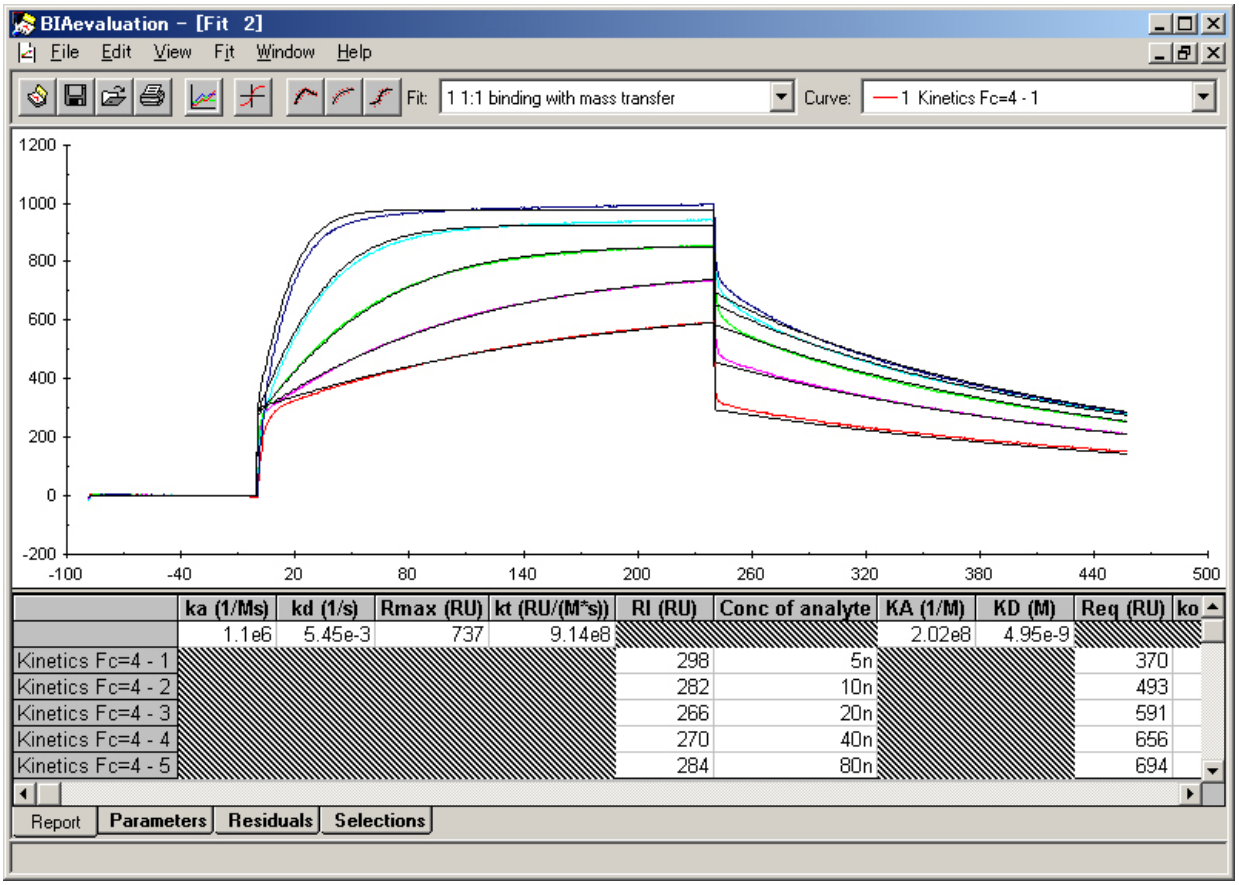
Conc の欄にアナライトの濃度（**モル濃度**）を入力する。入力には **M を省略**する。

	Conc
Kinetics Fc=4 - 1	5n
Kinetics Fc=4 - 2	10n
Kinetics Fc=4 - 3	20n
Kinetics Fc=4 - 4	40n
Kinetics Fc=4 - 5	80n

濃度の入力の仕方

単位	入力文字	例
aM	a	100 a
fM	f	100 f
pM	p	100 p
nM	n	100 n
µM	u	100 u
mM	m	100 m
M		100
kM	k	100 k

入力後、**Fit** をクリックする。



	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	kt (RU/(M*s))	RI (RU)	Conc of analyte	KA (1/M)	KD (M)	Req (RU)	ko
	1.1e6	5.45e-3	737	9.14e8			2.02e8	4.95e-9		
Kinetics Fc=4 - 1					298	5n			370	
Kinetics Fc=4 - 2					282	10n			493	
Kinetics Fc=4 - 3					266	20n			591	
Kinetics Fc=4 - 4					270	40n			656	
Kinetics Fc=4 - 5					284	80n			694	

フィッティングが完了すると、黒色の近似曲線グラフ、算出された各定数がテーブルに表示される。

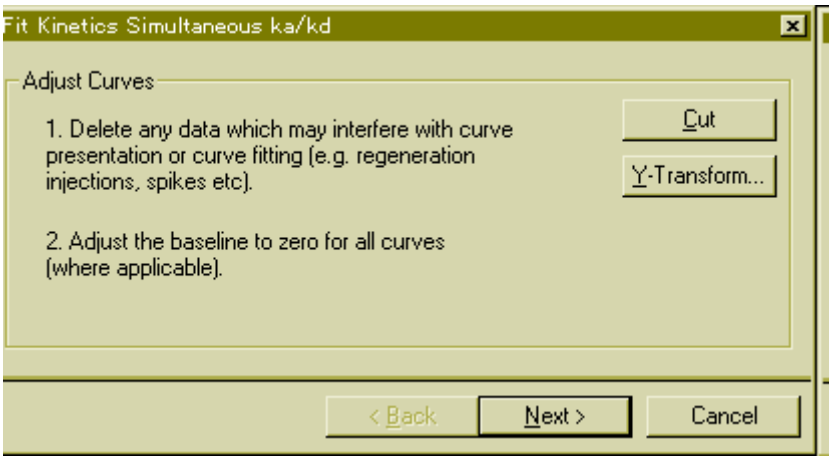
各定数の説明

k_a（1/Ms）	結合速度定数
k_d（1/s）	解離速度定数
Rmax（RU）	結合最大量
RI（RU）	溶液効果（bulk effect）
K_A（1/M）	親和定数
K_D（M）	解離定数
Req（RU）	平衡値

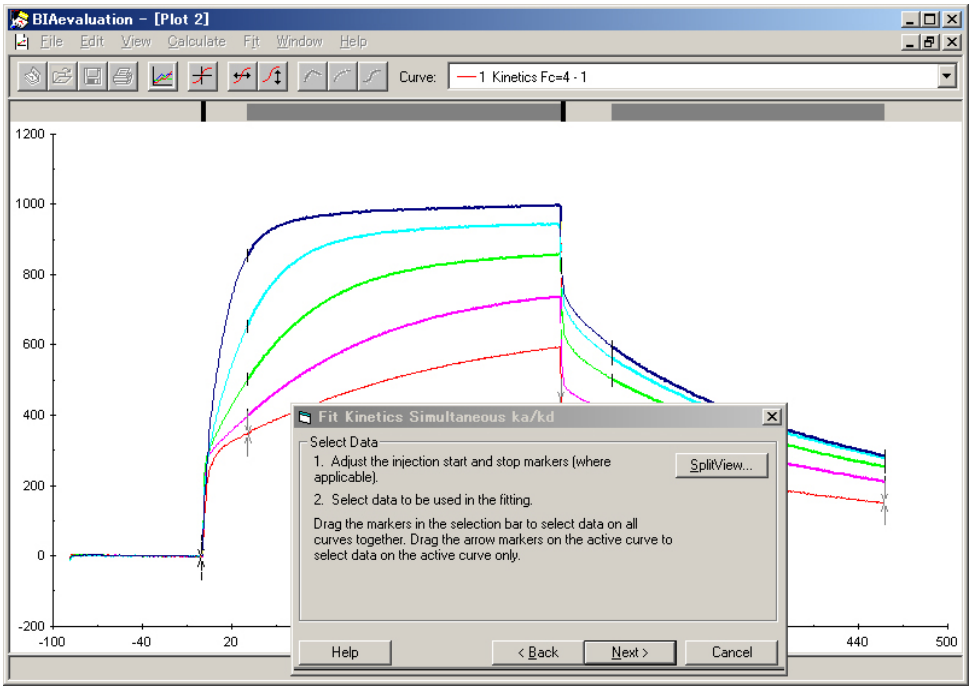
フィッティングが良好であれば、実験で取得したセンサーグラムと黒色の近似曲線はきわめて一致する。

2-2-2. 同時解析　（Local fitting による解析）

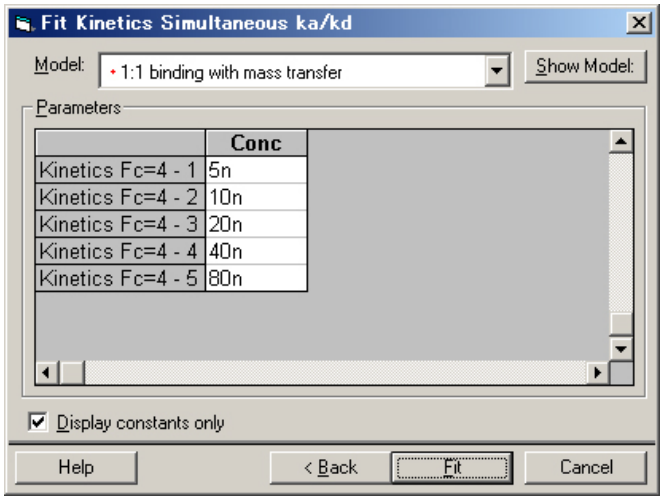
アイコン（ ）あるいは **Fit → Kinetics Simultaneous ka/kd** をクリックする。


Fit Kinetics Simultaneous ka/kd
Adjust Curves
1. Delete any data which may interfere with curve presentation or curve fitting (e.g. regeneration injections, spikes etc).
2. Adjust the baseline to zero for all curves (where applicable).
Cut
Y-Transform...
< Back
Next >
Cancel

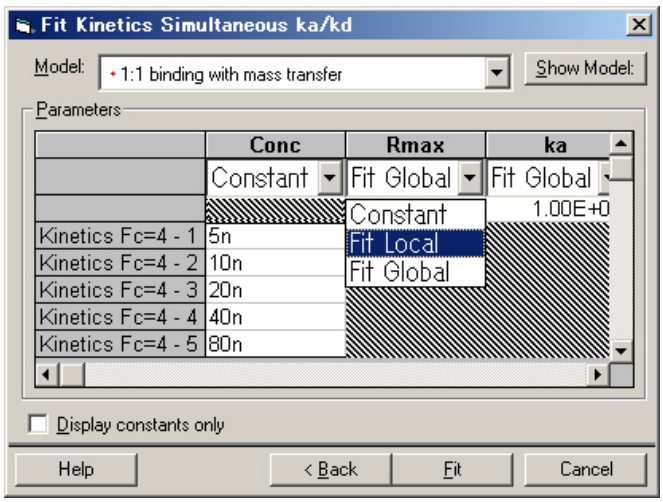
そのまま **Next>**をクリックする。



範囲の設定はそのままになっている。
Next>をクリックする。



次に、ボックス左下の☐ **Display constants only** のチェックをはずす。



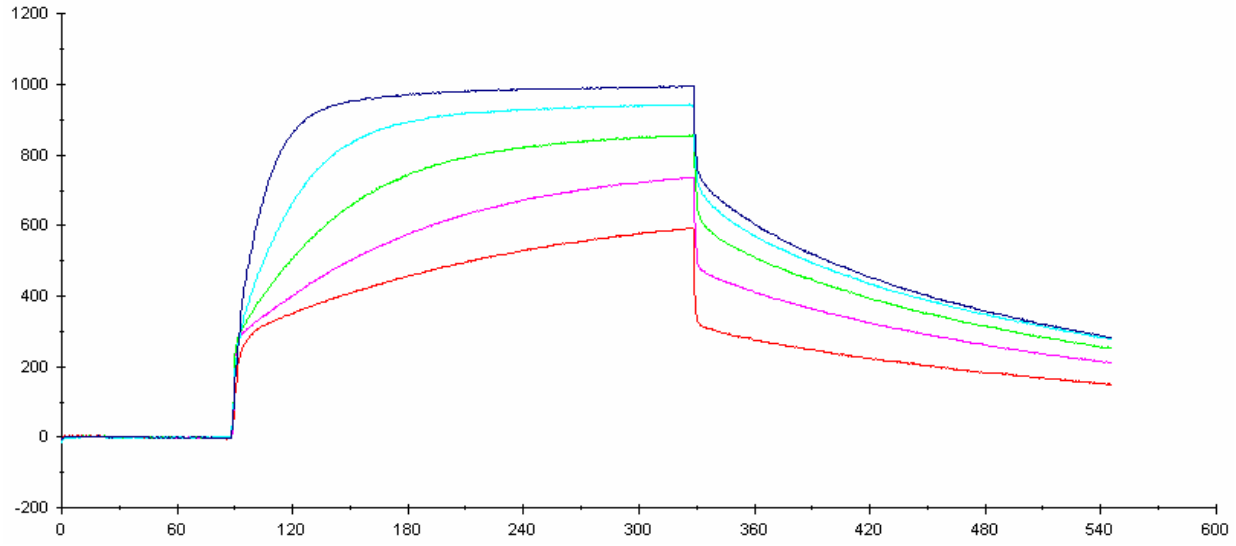
Parametersボックス中のRmax、k_a、k_d等の下の▼をそれぞれクリックし、Fit Globalを**Fit Local**に変更する。
変更後、**Fit** をクリックする。

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	kt (RU/(M*s))	RI (RU)	Conc of analyte	KA (1/M)	KD (M)	Req (RU)	kobs (1/s)	Chi2
											12.6
Kinetics Fc=4 - 1	1.71e6	6.05e-3	625	8.45e8	283	5n	2.82e8	3.54e-9	366	0.0146	
Kinetics Fc=4 - 2	1.06e6	5.05e-3	736	1.19e9	270	10n	2.09e8	4.78e-9	498	0.0156	
Kinetics Fc=4 - 3	9.33e5	4.85e-3	738	1.34e9	271	20n	1.92e8	5.2e-9	586	0.0235	
Kinetics Fc=4 - 4	7.97e5	4.73e-3	746	1.34e9	287	40n	1.69e8	5.93e-9	650	0.0366	
Kinetics Fc=4 - 5	7.06e5	4.77e-3	749	1.61e9	294	80n	1.48e8	6.76e-9	691	0.0613	

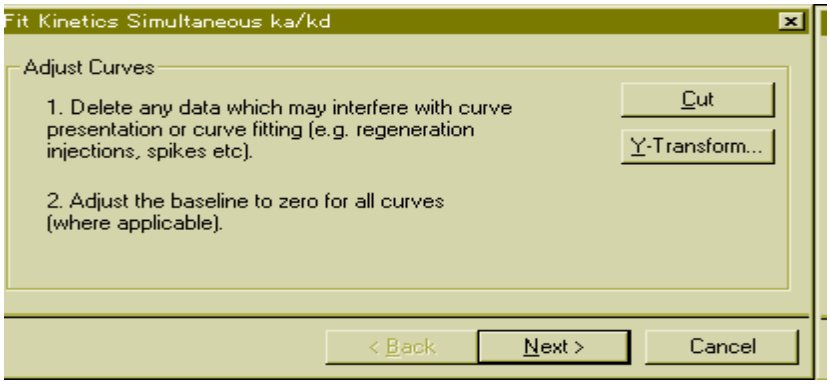
それぞれのセンサーグラムからの定数が表示される。

2-3.分割解析

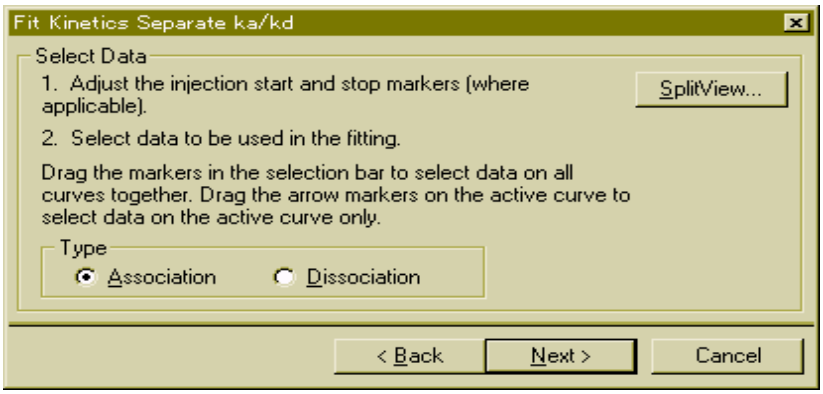
ファイル C:/Program files/Biaeval/kinetics.bleを使用して説明する。
ファイルの呼び出しおよび重ね書きを行う。



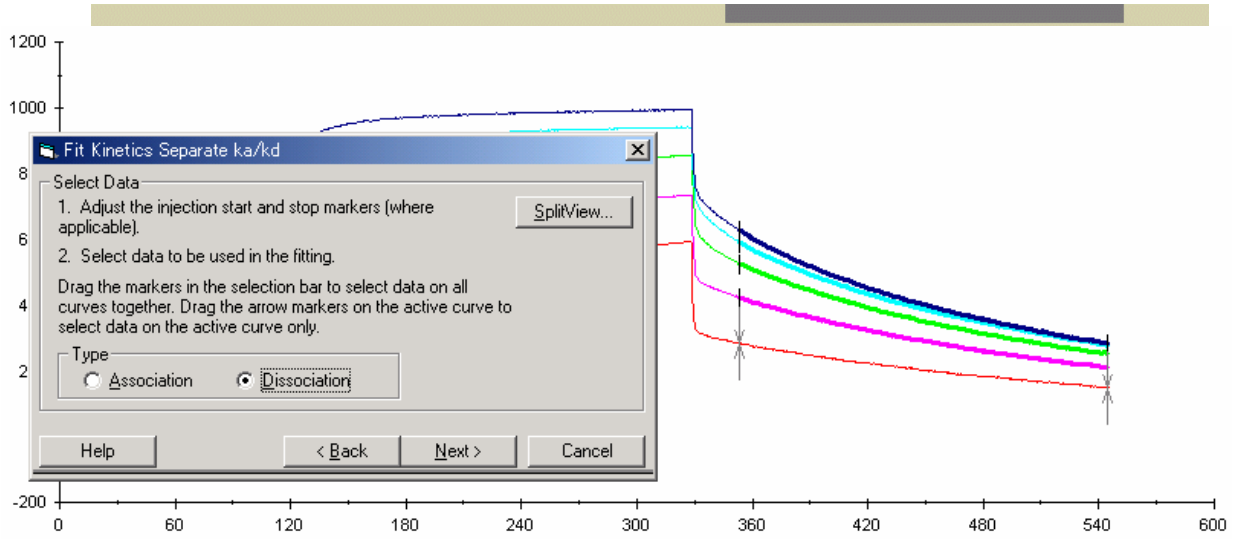
アイコン（ ）あるいは **Fit → Kinetics Separate ka/kd** をクリックする。


Fit Kinetics Simultaneous ka/kd
Adjust Curves
1. Delete any data which may interfere with curve presentation or curve fitting (e.g. regeneration injections, spikes etc).
Cut
Y-Transform...
2. Adjust the baseline to zero for all curves (where applicable).
< Back
Next >
Cancel

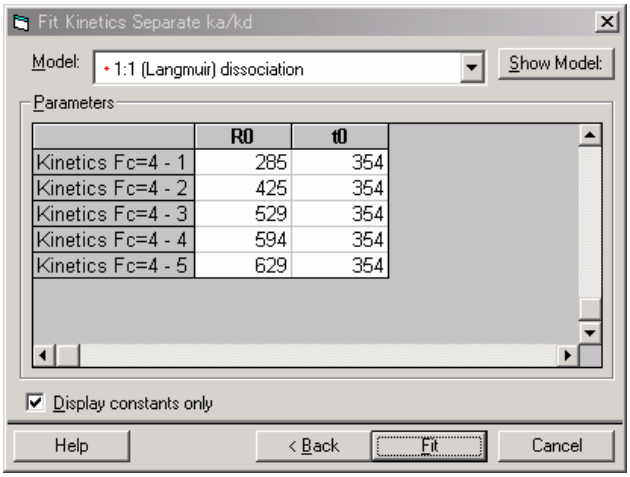
Next>をクリックする。


Fit Kinetics Separate ka/kd
Select Data
1. Adjust the injection start and stop markers (where applicable).
SplitView...
2. Select data to be used in the fitting.
Drag the markers in the selection bar to select data on all curves together. Drag the arrow markers on the active curve to select data on the active curve only.
Type
Association
Dissociation
< Back
Next >
Cancel

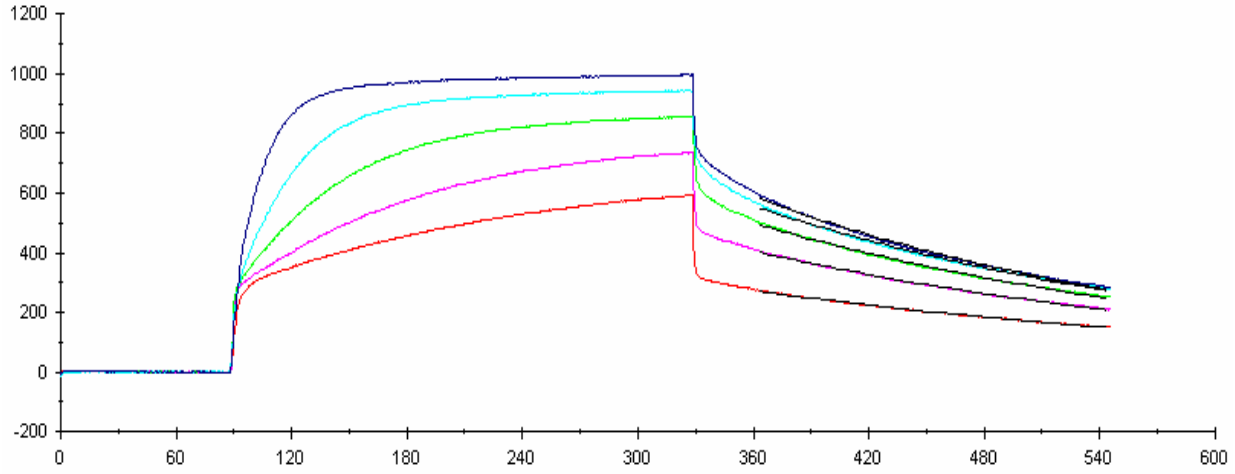
中の○ **Dissociation** をチェックする。次に、**解析範囲**（　　）の両端を左右に広げ、反応領域を設定する（通常はインジェクションの終了直後を避けて全体を設定する）。



設定後、**Next>**をクリックする。



Fit をクリックする。

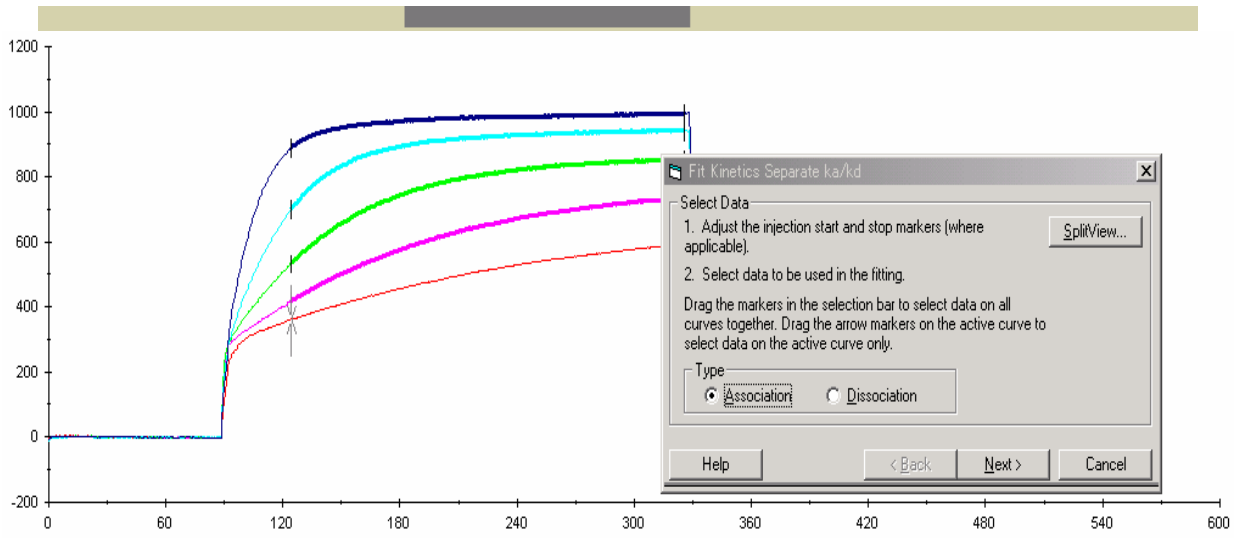


	kd (1/s)	Chi2
		22.3
Kinetics Fc=4 - 1	3.23e-3	
Kinetics Fc=4 - 2	3.57e-3	
Kinetics Fc=4 - 3	3.73e-3	
Kinetics Fc=4 - 4	3.76e-3	
Kinetics Fc=4 - 5	3.99e-3	

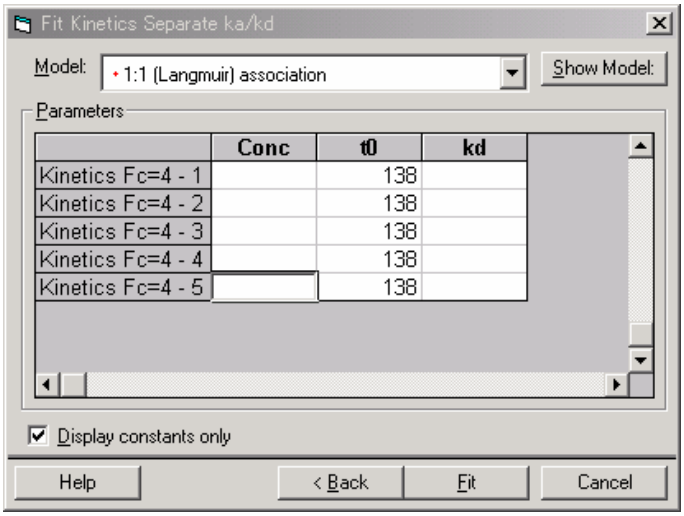
解離速度定数（k_d）が算出される。

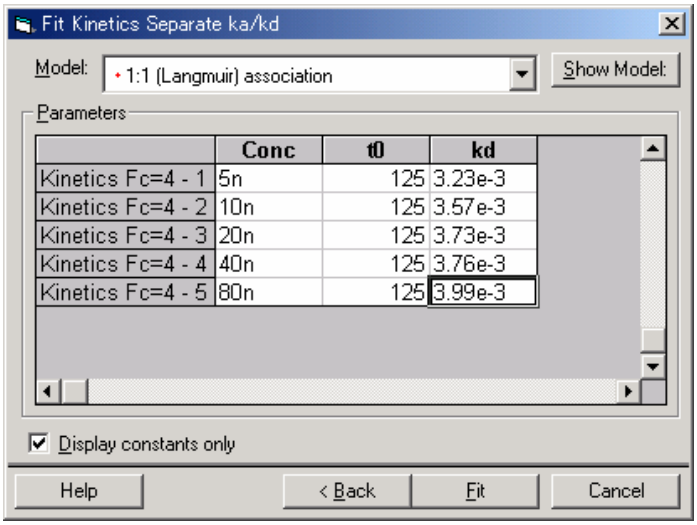
再び、アイコン（ ）あるいは **Fit → Kinetics Separate ka/kd** をクリックする。

中の○ **Association** をチェックする。次に、**解析範囲**（ ）の両端を左右に広げ、反応領域を設定する（通常はインジェクションの開始直後を避けて全体を設定する）。

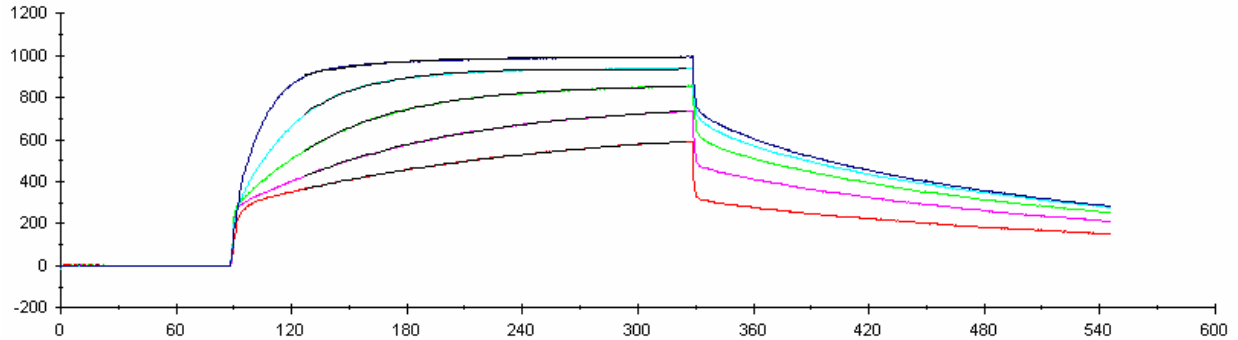


設定後、**Next>**をクリックする。





アナライト濃度、k_d（解離速度定数）を入力し、**Fit**をクリックする。



	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)	Conc of analyte	KA (1/M)	KD (M)	Req (RU)	kobs (1/s)	Chi2
										3.2
Kinetics Fc=4 - 1	6.65e5	3.23e-3	625	361	5n	2.06e8	4.86e-9	317	6.55e-3	
Kinetics Fc=4 - 2	6.74e5	3.57e-3	558	418	10n	1.89e8	5.29e-9	365	0.0103	
Kinetics Fc=4 - 3	7.32e5	3.73e-3	411	534	20n	1.96e8	5.09e-9	327	0.0184	
Kinetics Fc=4 - 4	6.49e5	3.76e-3	264	709	40n	1.73e8	5.79e-9	230	0.0297	
Kinetics Fc=4 - 5	3.02e5	3.99e-3	103	903	80n	7.58e7	1.32e-8	88.5	0.0282	

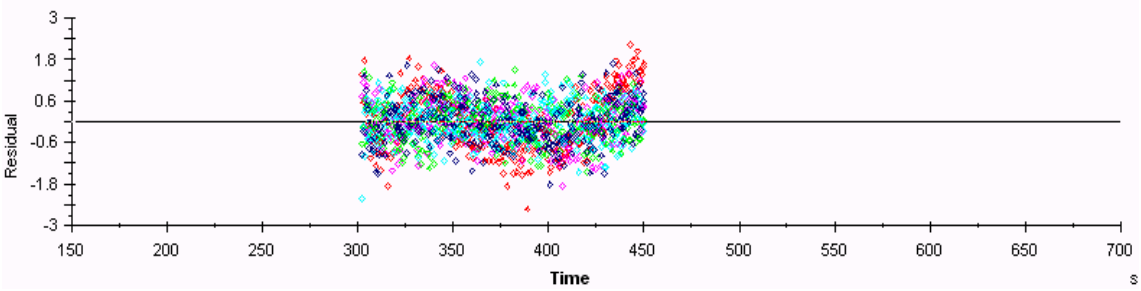
フィッティングが良好であるかの判断

①Report テーブル右端の **Chi2** が**最大レスポンスの 1/10 程度**以下であれば、フィッティングは良好である。

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)	Conc of analyte	KA (1/M)	KD (M)	Req (RU)	kobs (1/s)	Chi2
										3.2
Kinetics Fc=4 - 1	6.65e5	3.23e-3	625	361	5n	2.06e8	4.86e-9	317	6.55e-3	
Kinetics Fc=4 - 2	6.74e5	3.57e-3	558	418	10n	1.89e8	5.29e-9	365	0.0103	
Kinetics Fc=4 - 3	7.32e5	3.73e-3	411	534	20n	1.96e8	5.09e-9	327	0.0184	
Kinetics Fc=4 - 4	6.49e5	3.76e-3	264	709	40n	1.73e8	5.79e-9	230	0.0297	
Kinetics Fc=4 - 5	3.02e5	3.99e-3	103	903	80n	7.58e7	1.32e-8	88.5	0.0282	

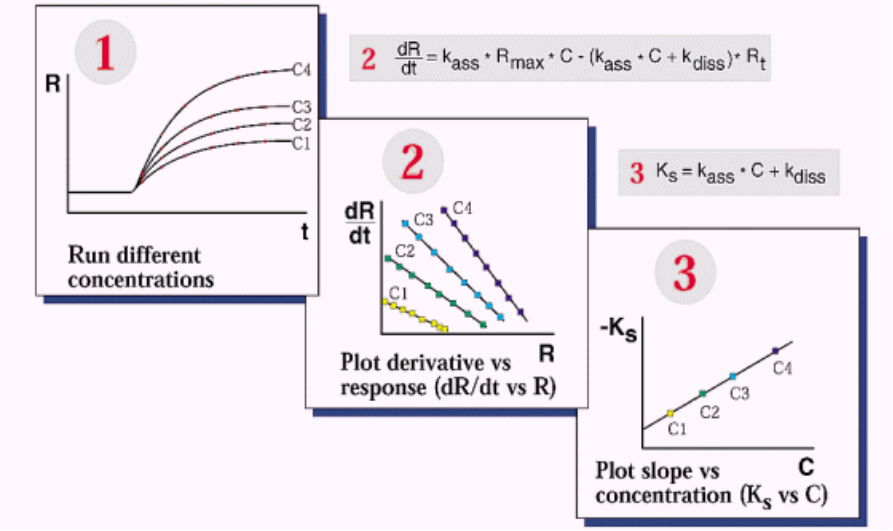
Report | Parameters | Residuals | Selections

②**Residuals** をクリックし、直線を軸に上下に平均的にバラついていれば、フィッティングは良好である。



2-4.線形解析

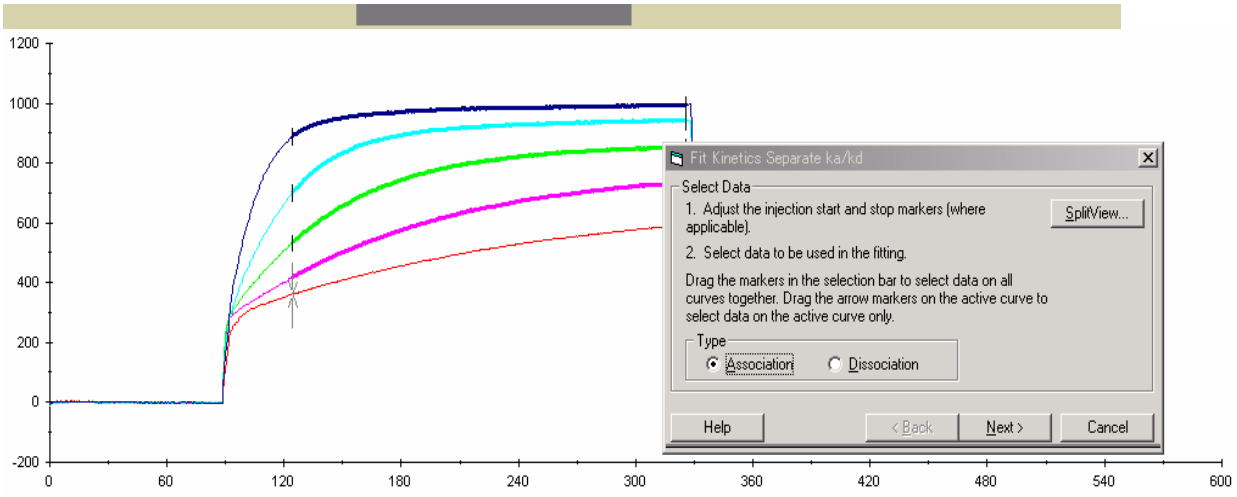
この方法では、各濃度における速度の傾きから結合速度定数（k_a）および解離速度定数（k_d）を算出する方法である。



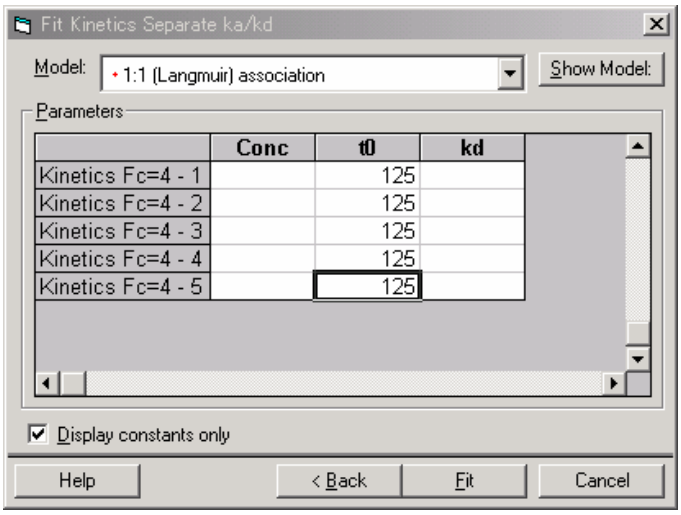
グラフ 3 において、グラフの角度が結合速度定数（k_a）に、Y軸との切片が解離速度定数（k_d）となる。しかし、ここで求まるk_dは、きわめて 0 に近いため、データの信頼性が低いことが指摘されているので、注意が必要である。

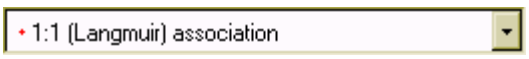
アイコン（ ）あるいは **Fit → Kinetics Separate ka/kd...**をクリックする。

中の**○ Association** をチェックする。次に、**解析範囲**（ ）の両端を左右に広げ、反応領域を設定する（通常はインジェクションの開始直後を避けて全体を設定する）。



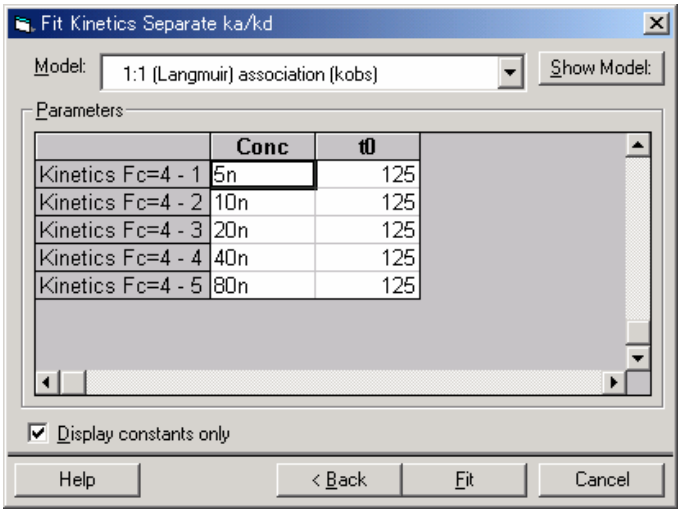
設定後、**Next>**をクリックする。



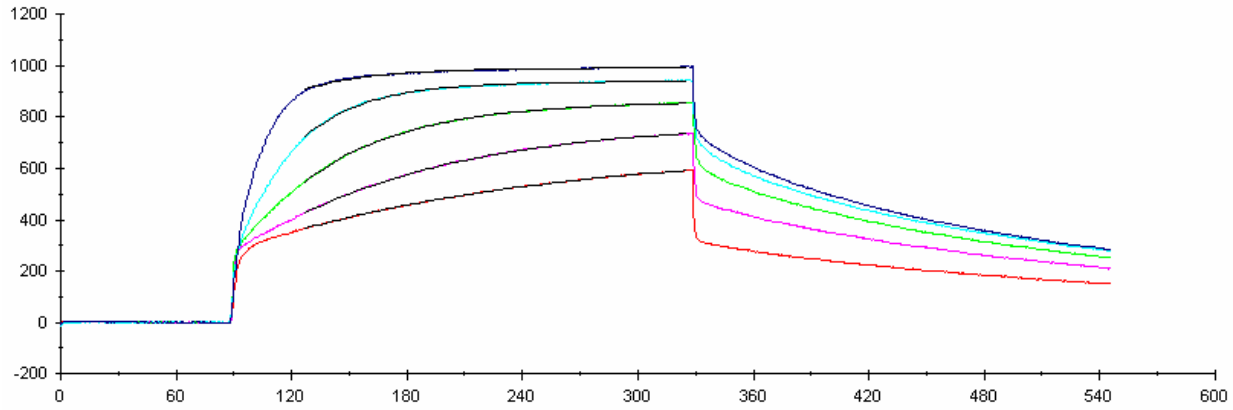


の▼を用いて、反応モデルの選択を行う。

1:1(Langmuir) association(kobs)を選択する。

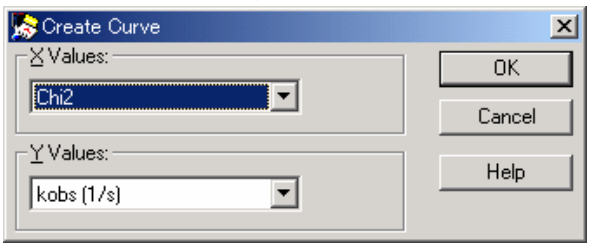


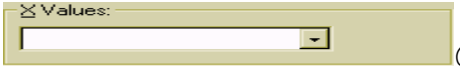
アナライトの濃度を入力し、**Fit** をクリックする。



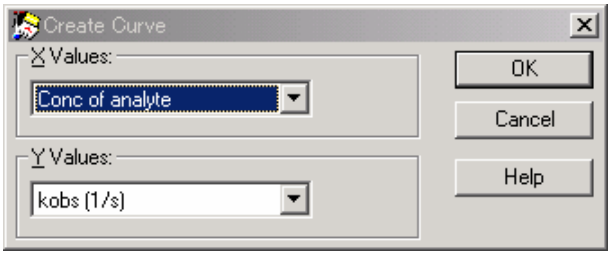
	kobs (1/s)	Req (RU)	RI (RU)	Conc of analyte	Chi2
					12.1
Kinetics Fc=4 - 1	6.66e-3	373	302	5n	
Kinetics Fc=4 - 2	9.97e-3	473	314	10n	
Kinetics Fc=4 - 3	0.0179	514	349	20n	
Kinetics Fc=4 - 4	0.0314	527	410	40n	
Kinetics Fc=4 - 5	0.0567	430	556	80n	

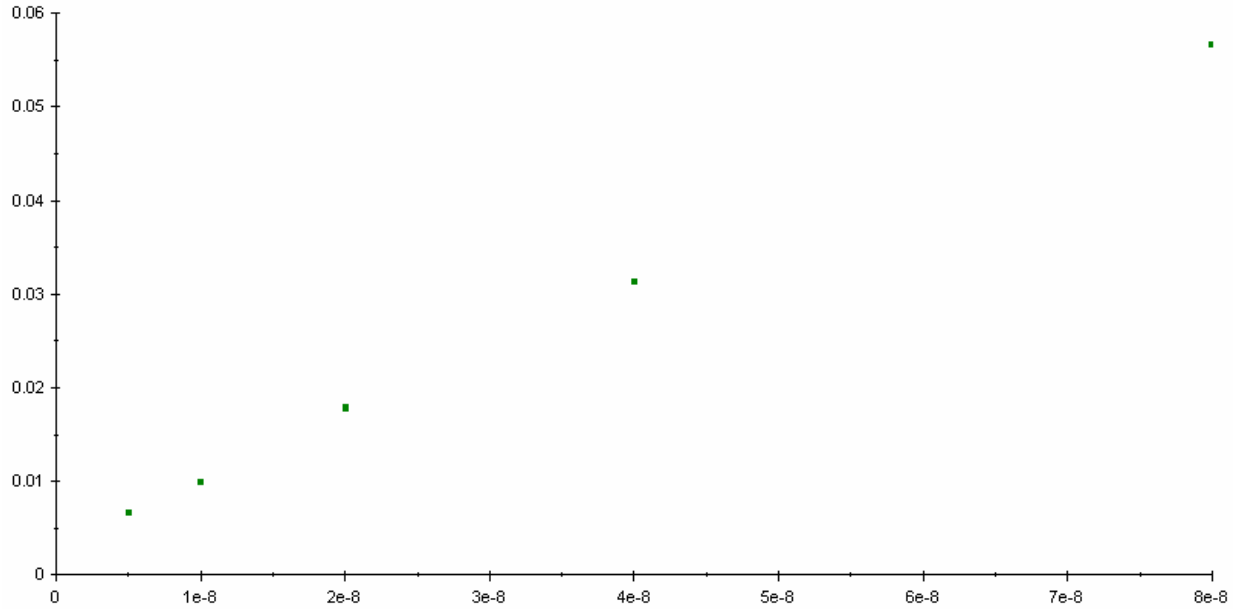
Fit → Plot Parameters...をクリックする。



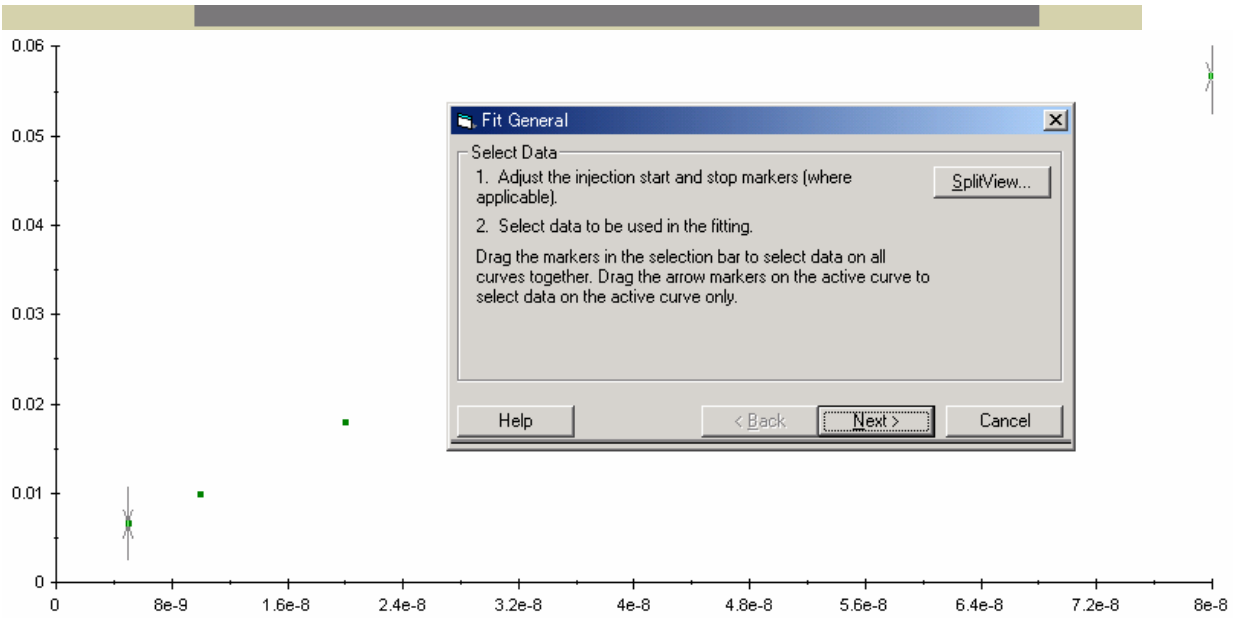


の▼を用いて、**X Values:**に**Conc of analyte**、**Y Values:**に、**kobs［1/s］**に設定し、**OK**をクリックする。



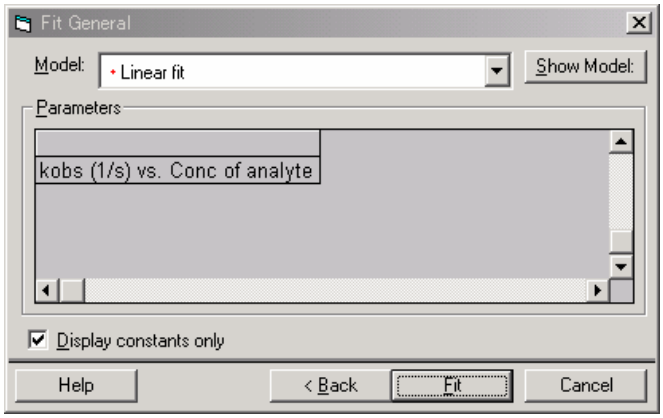


アイコン（ ）あるいは **Fit → General ...**をクリックする。

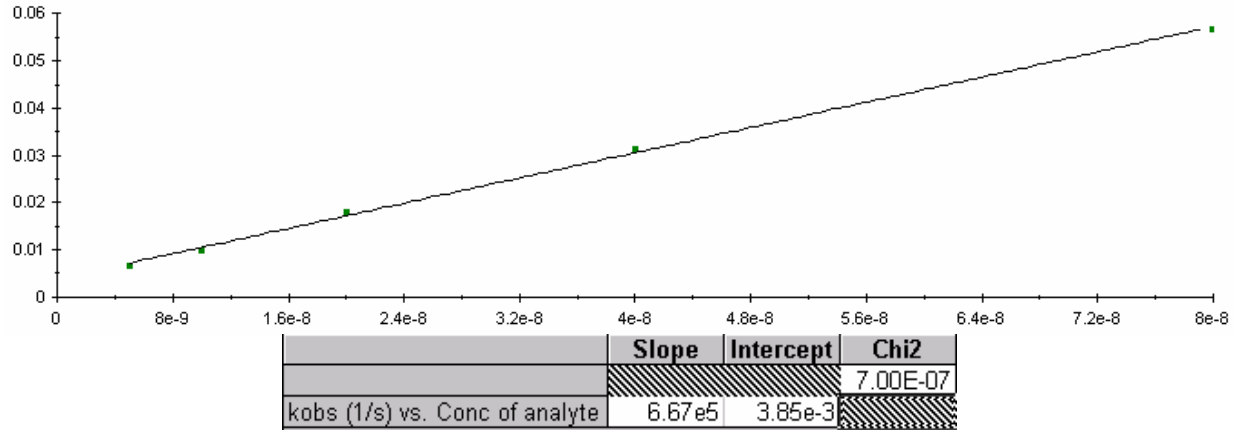


選択領域（　）を左右に広げ、プロットすべてを選択する。
Next>をクリックする。

の▼で、**Linear fit** を選択する。



Fit をクリックする。



Slopが結合速度定数（k_a）、**Intercept**が解離速度定数(k_d)に相当する。

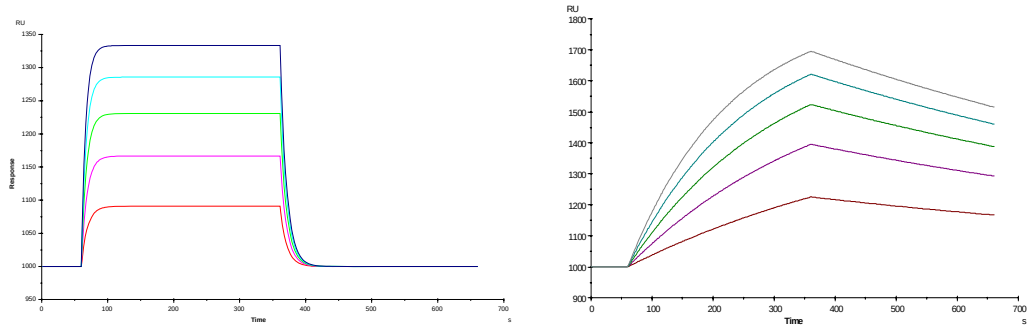
3. 平衡値からの解離定数の算出（平衡値解析）

親和性の弱い相互作用の場合（特に解離が速い場合）に反応はきわめて早く平衡(Req)へと移行する。

（例）

$k_a = 1\times10^5\ M^{-1}s^{-1}$　　$k_a = 1\times10^5\ M^{-1}s^{-1}$

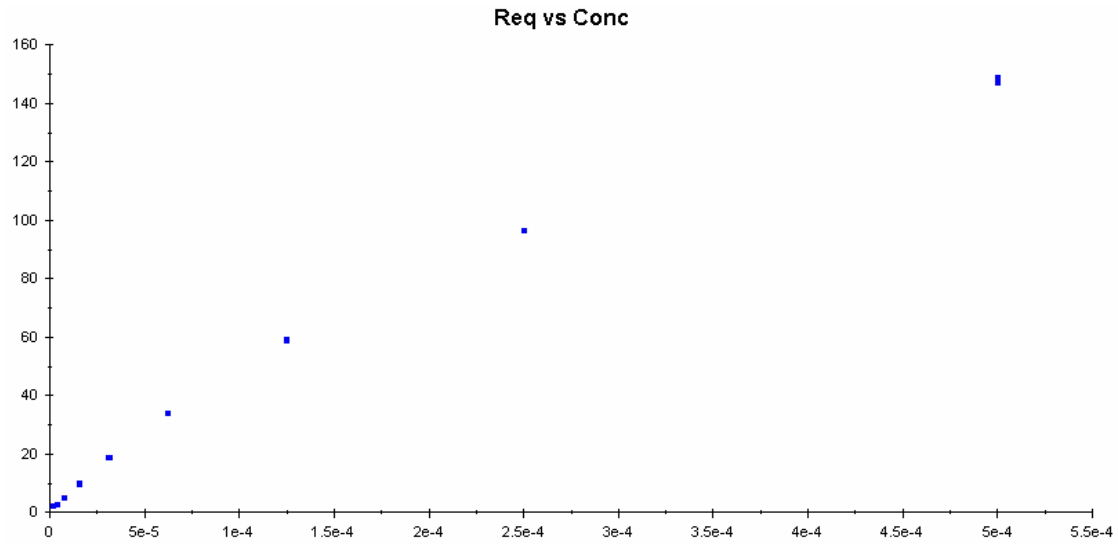
$k_d = 1\times10^{-1}\ s^{-1}$　　$k_d = 1\times10^{-3}\ s^{-1}$



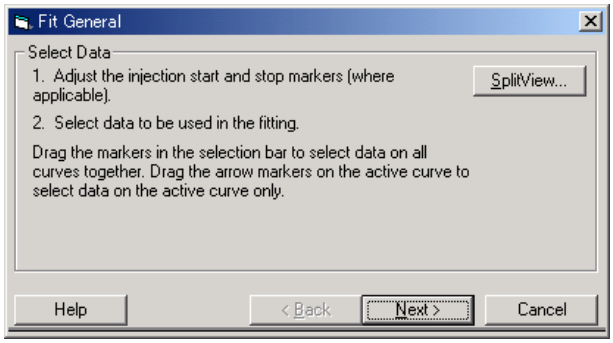
このため、**平衡値（Req）**と**アナライト濃度（C）**とのプロットから、**親和定数（K_A）**あるいは**解離定数（K_D）**を算出することが可能である。
（しかし、結合に伴いレスポンスが上昇する結合領域、および解離に伴いレスポンスが下降する解離領域はきわめて短く、反応速度定数の算出は困難。）

平衡状態においては、Req と C との関係は、以下の関係式が成り立つ。

$$Req = K_AC/(1+K_AC)$$

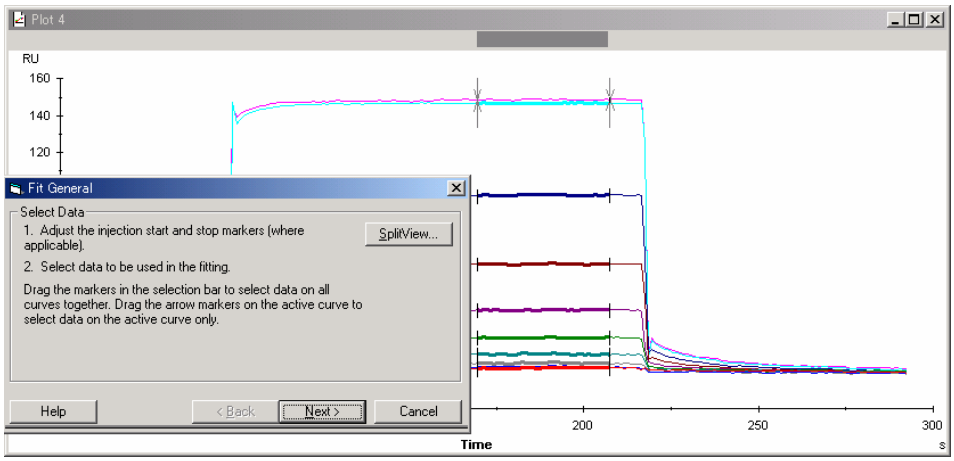


アイコン（ ）あるいは **Fit → General** をクリックする。



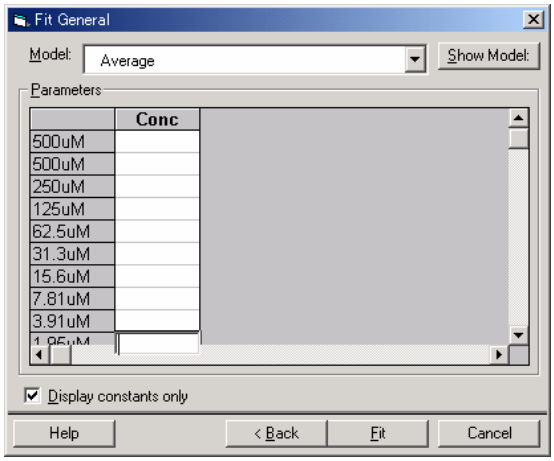
センサーグラム上部の**選択領域**（　）を移動、もしくは**選択領域**（　）の両端を左右に調整し、平衡領域を設定する。

反応平衡領域

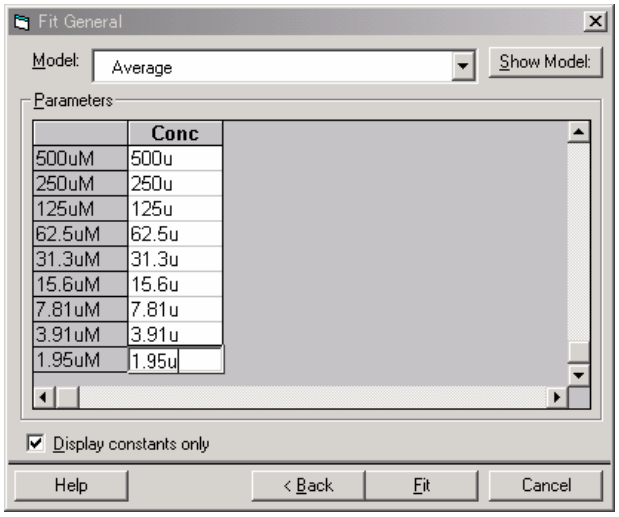


Next>をクリックする。

の▼から、**Average** を選択する。

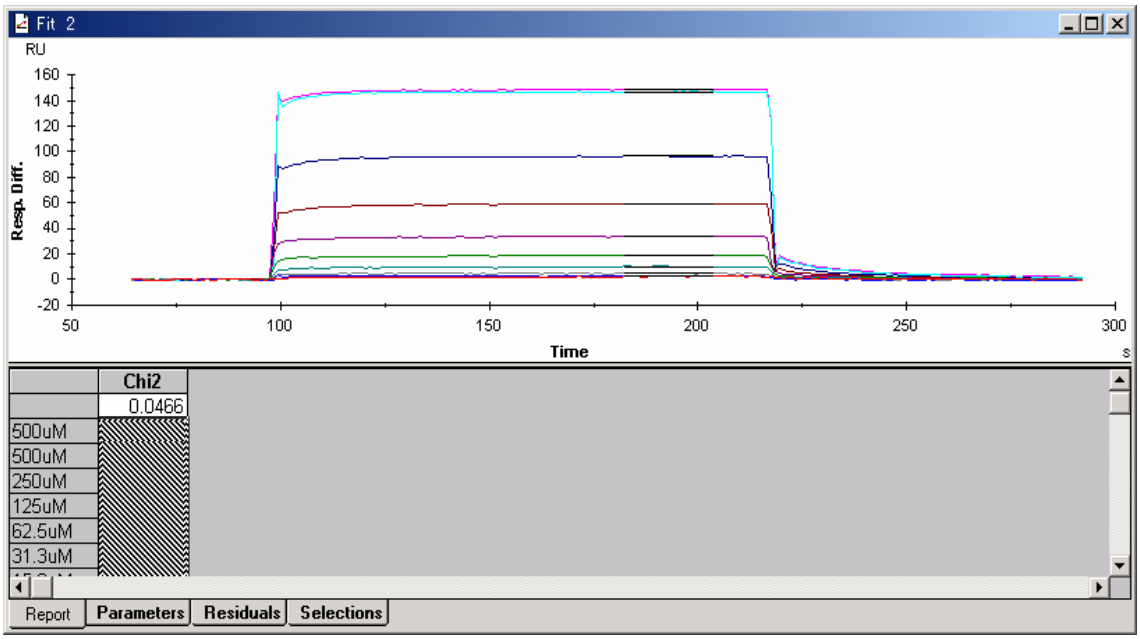


アナライトの濃度を入力する。



Fit をクリックする。

↓

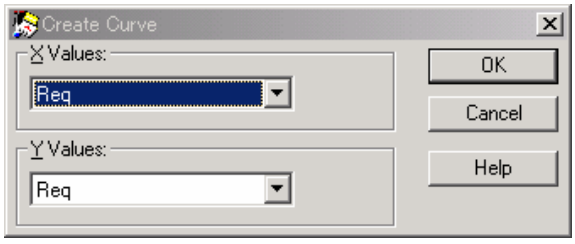


テーブルセレクションバーの **Parameters** をクリックする。

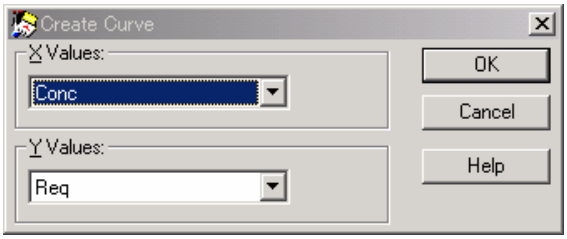
	Req	SE(Req)	Conc
500uM	149	0.0441	500u
500uM	147	0.0441	500u
250uM	96.7	0.0441	250u
125uM	59	0.0441	125u
62.5uM	34	0.0441	62.5u
31.3uM	18.8	0.0441	31.3u
15.6uM	9.92	0.0441	15.6u
7.81uM	5.03	0.0441	7.81u
3.91uM	2.69	0.0441	3.91u
1.95uM	2.23	0.0441	1.95u

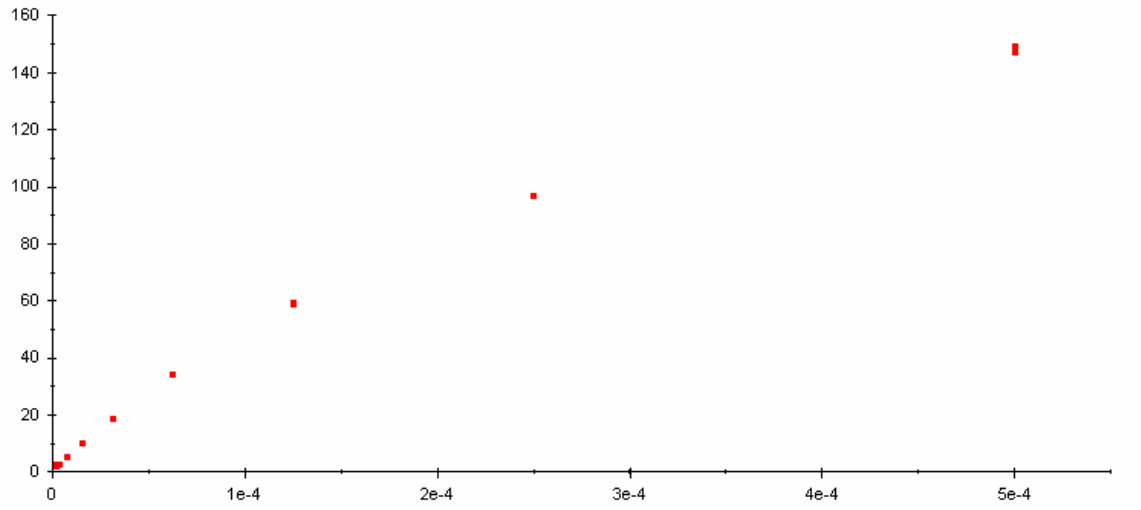
各アナライト濃度における平衡値（Req）が表示される。

Fit → Plot Parameters...をクリックする。

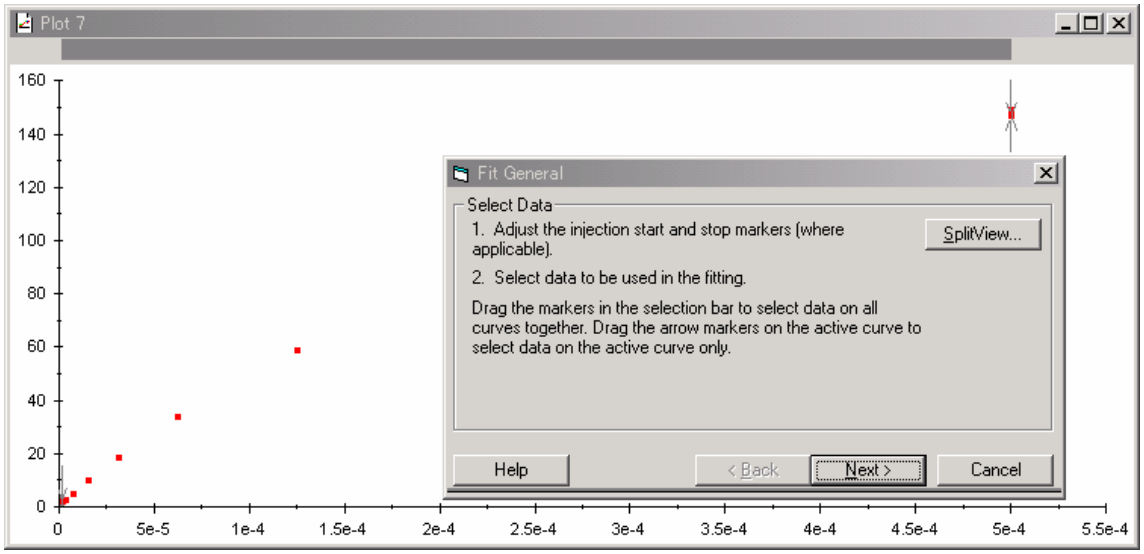


の▼を用いて、**X Values:**に**Conc**、**Y Values:**に**Req**を設定し、**OK**をクリックする。



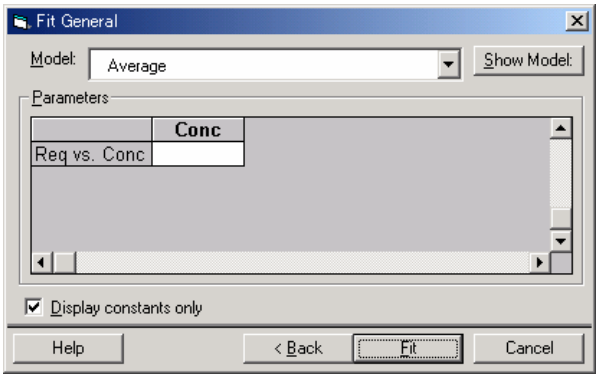


アイコン（ ）あるいは **Fit → General...**をクリックする。

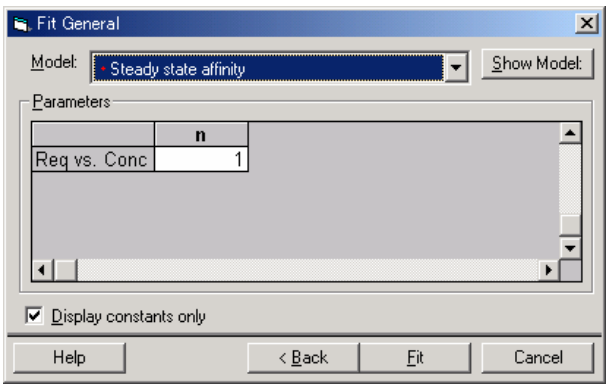


選択領域（　）を左右に広げ、プロットすべて選択する。

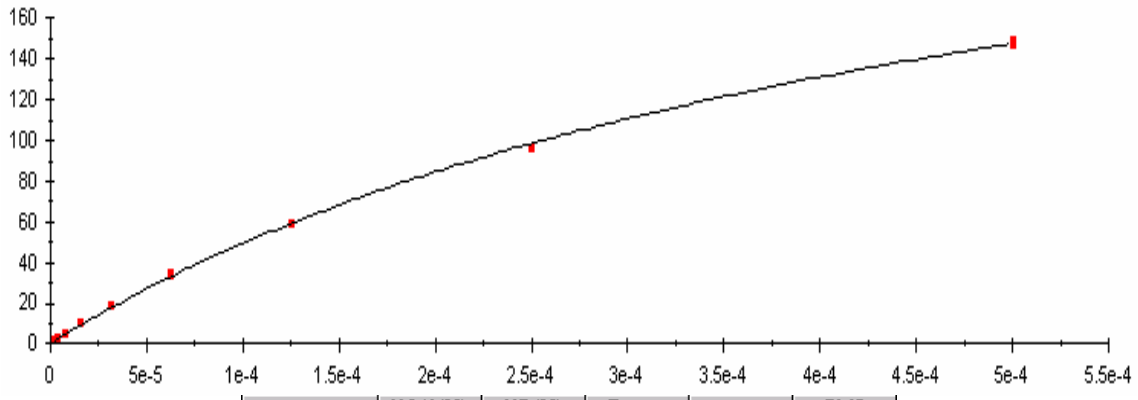
設定後、**Next>**をクリックする。



の□を用いて、**Steady state affinity** を選択する。



Fit をクリックする。



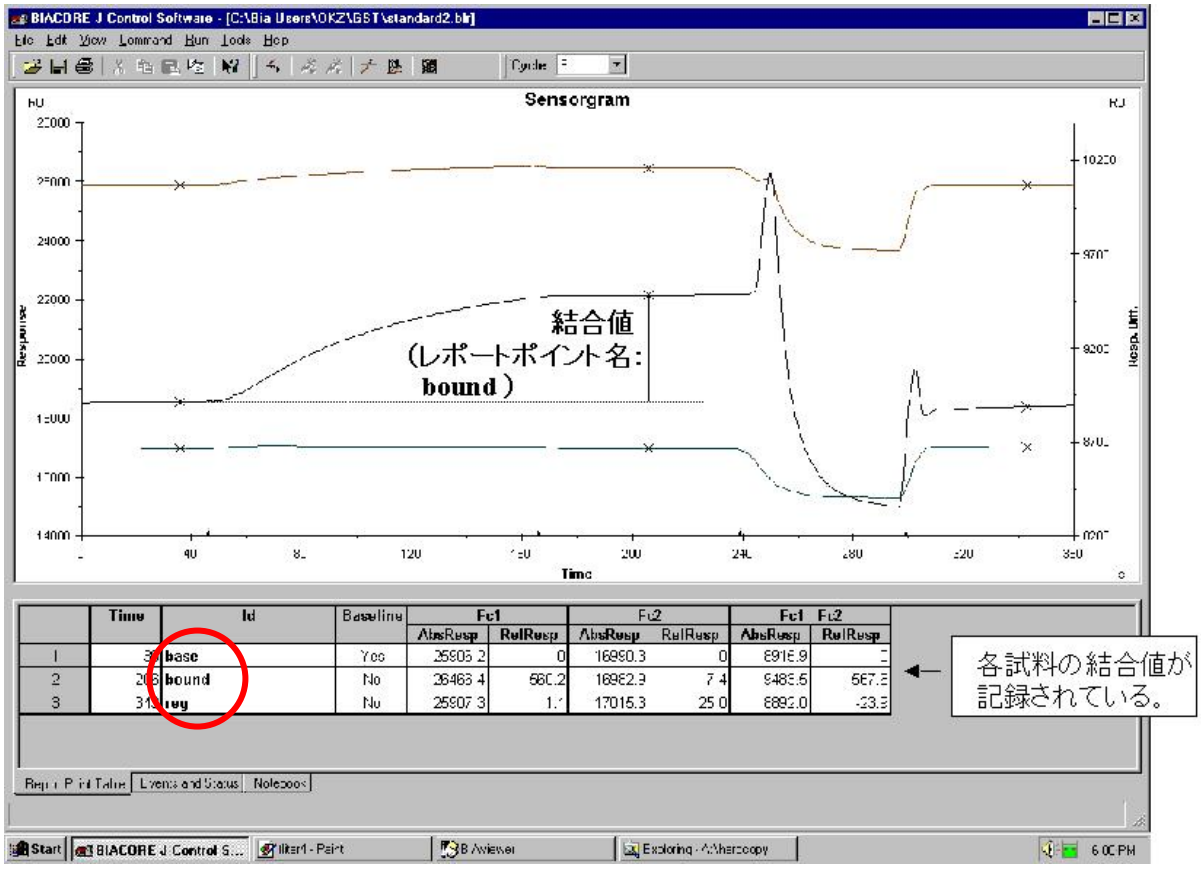
	KA(1/M)	KD(M)	Rmax	n	Chi2
	2.01e3	4.98e-4	295		1.4
Req vs. Conc				1	

親和定数（K_A）および解離定数（K_D）が表示される。

4. 濃度測定

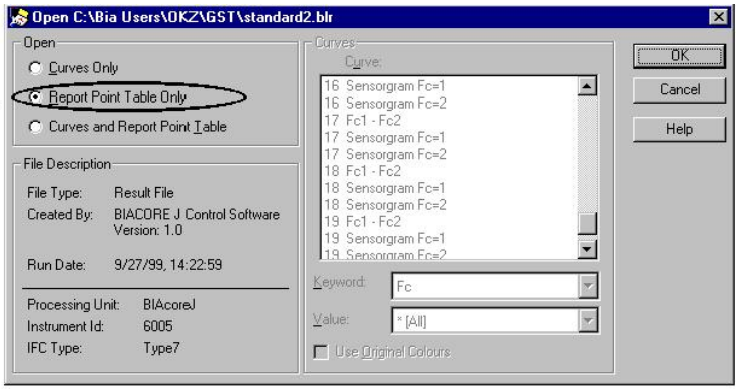
Biacore を用いた濃度測定には、分子間の相互作用を利用する。
濃度を測定したい分子に特異的に反応する分子（多くは抗体）をセンサーチップ表面に固定化し、濃度 C 既知のスタンダードサンプルの結合量 RelResp を測定し、検量線（RelResp vs C）を作成する。次に、濃度未知のサンプルについて、同様に測定を行い、結合量を測定する。その結合量を検量線と対応させ、濃度を決定する。

濃度測定については、相互作用測定時、サンプルごとに測定サイクルを切替え、測定をとおして統一したレポートポイント名で数値データを記録する。レポートポイントを取る位置も統一させる。

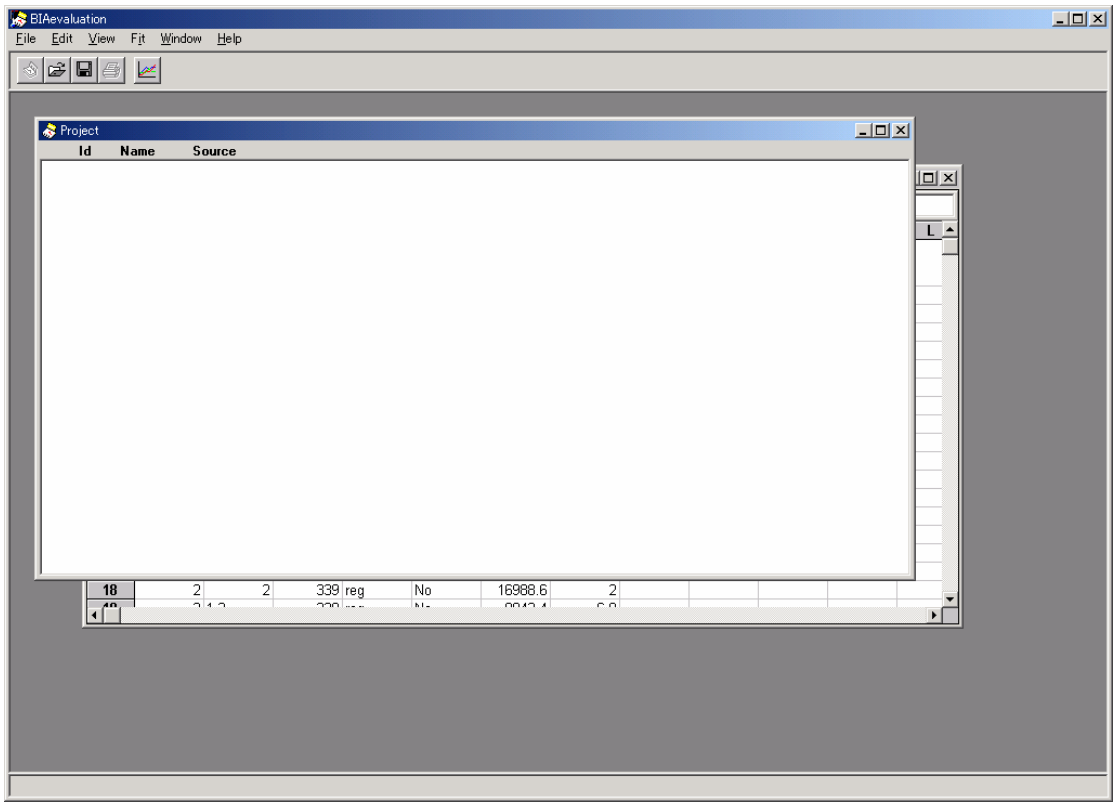


4-1.ファイルの呼び出し

File → **Open** をクリックし、目的のファイルを選択し、**OK** をクリックする。



Report Point　Table Onlyをチェックした後、**OK**をクリックする。



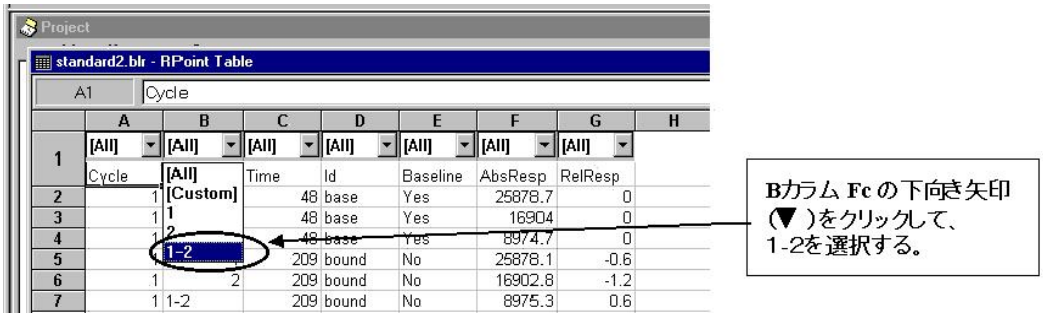
メニュバーの **Window** で画面表示を切り替えると、記録したすべての Report Point Table が表示される。

H14

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	[All]	[All]	[All]	[All]	[All]	[All]	[All]					
	Cycle	Fc	Time	Id	Baseline	AbsResp	RelResp					
2	1	1	42	base	Yes	25861.6	0					
3	1	2	42	base	Yes	16990.3	0					
4	1	1-2	42	base	Yes	8871.3	0					
5	1	1	201	bound	No	25860.8	-0.8					
6	1	2	201	bound	No	16986.1	-4.2					
7	1	1-2	201	bound	No	8874.7	3.4					
8	1	1	369	reg	No	25836.6	-25					
9	1	2	369	reg	No	16988.1	-2.2					
10	1	1-2	369	reg	No	8848.5	-22.8					
11	2	1	45	base	Yes	25836.9	0					
12	2	2	45	base	Yes	16986.6	0					
13	2	1-2	45	base	Yes	8850.3	0					
14	2	1	206	bound	No	25913.2	76.3					
15	2	2	206	bound	No	16981.8	-4.8					
16	2	1-2	206	bound	No	8931.4	81.1					
17	2	1	339	reg	No	25832	-4.9					
18	2	2	339	reg	No	16988.6	2					

4-2. データの抽出

各カラム上段のフィルター（[All]）を用い、必要な情報を抽出する。



Fc の項目は特異的結合レスポンスのみを反映したセル(Fc1-2 もしくは Fc2-1)、Id の項目は結合量を反映した Report Point 名（bound 等）を設定する。

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	[All]	1-2	[All]	bound	[All]	[All]	[All]	
	Cycle	Fc	Time	Id	Baseline	AbsResp	RelResp	
7	1	1-2	198	bound	No	8877.2	-2.6	
16	2	1-2	208	bound	No	8846.5	46.6	
25	3	1-2	203	bound	No	8875.3	83	
34	4	1-2	195	bound	No	8943.8	147.6	
43	5	1-2	211	bound	No	9039.9	257.4	
52	6	1-2	208	bound	No	9186.6	388.8	

注意

フィルター[All]が表示されていない場合には、**Data** → **Filter** をクリックすると表示させることができる。

4-3. 測定濃度の入力

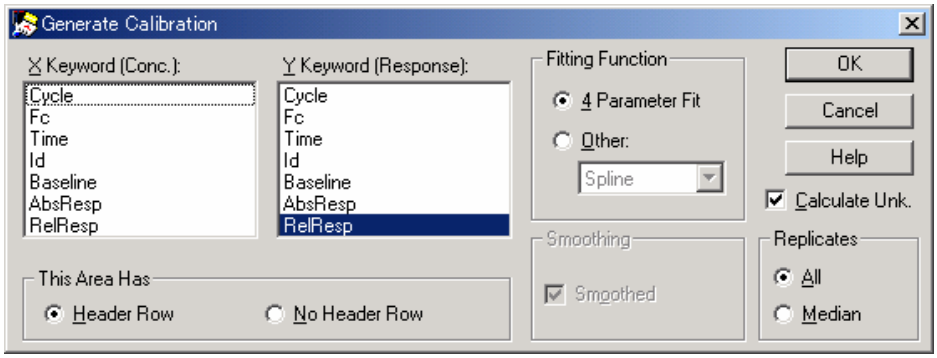
抽出したテーブルに濃度入力カラムを追加する。
①最上段に濃度の単位、②各スタンダードサンプル測定セルに濃度、③各未知濃度の測定サンプルセルに名称を入力する。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	[All]	1-2	[All]	bound	[All]	[All]	[All]		
	Cycle	Fc	Time	Id	Baseline	AbsResp	RelResp	ng/ml	
7	1	1-2	209	bound	No	8975.3	0.6	0	
16	2	1-2	204	bound	No	9025.1	48.6	62.5	
25	3	1-2	224	bound	No	9034.5	98.5	125	
34	4	1-2	215	bound	No	9102.5	169.6	250	
43	5	1-2	227	bound	No	9218.7	283.9	500	
52	6	1-2	219	bound	No	9374.4	434.3	1000	
61	7	1-2	225	bound	No	9523.8	588.2	2000	
70	8	1-2	222	bound	No	9606.6	672.7	4000	
79	9	1-2	206	bound	No	9483.5	567.6	2000	
88	10	1-2	214	bound	No	9338.3	433.2	1000	
97	11	1-2	220	bound	No	9171.5	281.2	500	
106	12	1-2	217	bound	No	9050.3	166.6	250	
115	14	1-2	206	bound	No	8920.9	52.5	62.5	
124	15	1-2	206	bound	No	8867.4	5.8	0	
133	16	1-2	202	bound	No	8900.9	44	gst50	
142	17	1-2	213	bound	No	8940.4	87	gst100	
151	18	1-2	212	bound	No	9005	149.8	gst200	
160	19	1-2	213	bound	No	9113.1	255.1	gst400	

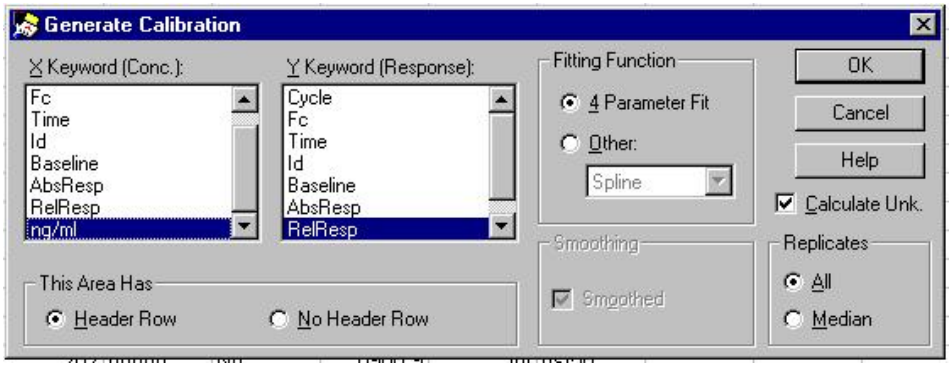
①
②
③

4-4. 検量線の作成

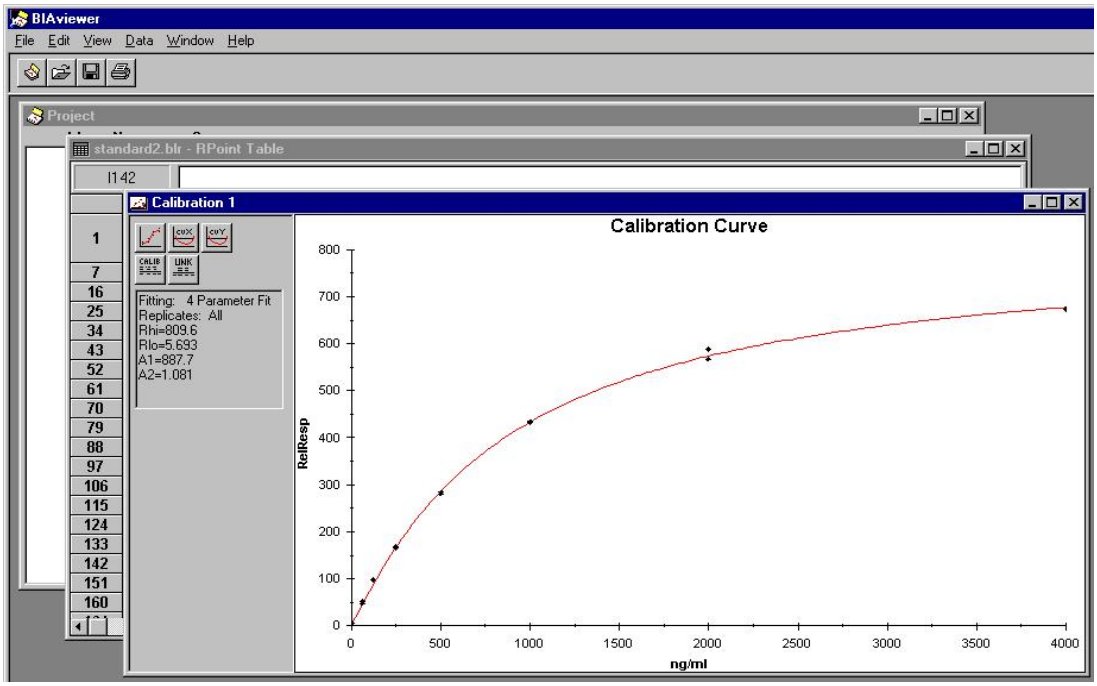
Data → Generate Calibration をクリックする。



X Keyword に濃度単位（ng/ml 等）に、 Y Keyword に RelResp を設定し、**OK** をクリックする。

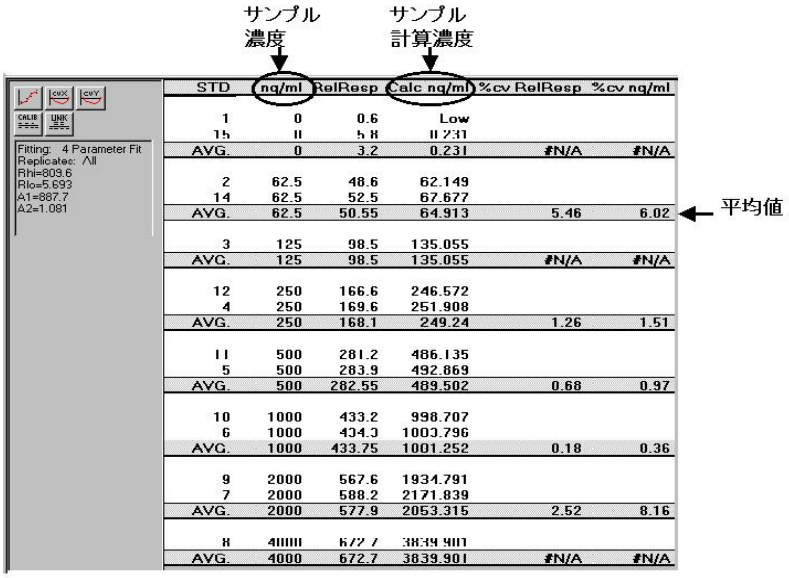


Calibration Curve が作成される。



4-5. 濃度の算出

サンプル濃度の算出は、グラフ左の をクリックする。



STD	ng/ml	RelResp	Calc ng/ml	%cv RelResp	%cv ng/ml
1	0	0.6	Low		
15	0	5.8	0.231		
AVG.	0	3.2	0.231	#N/A	#N/A
2	62.5	48.6	62.149		
14	62.5	52.5	67.677		
AVG.	62.5	50.55	64.913	5.46	6.02
3	125	98.5	135.055		
AVG.	125	98.5	135.055	#N/A	#N/A
12	250	166.6	246.572		
4	250	169.6	251.908		
AVG.	250	168.1	249.24	1.26	1.51
11	500	281.2	486.135		
5	500	283.9	492.869		
AVG.	500	282.55	489.502	0.68	0.97
10	1000	433.2	998.707		
6	1000	434.3	1003.796		
AVG.	1000	433.75	1001.252	0.18	0.36
9	2000	567.6	1934.791		
7	2000	588.2	2171.839		
AVG.	2000	577.9	2053.315	2.52	8.16
8	4000	672.7	3839.901		
AVG.	4000	672.7	3839.901	#N/A	#N/A

サンプルの濃度は、Calc.ng/ml のカラムに表示される。同一サンプルの濃度測定を複数回行った場合には平均値が表示されている。%CV 値も表示される。

www.gelifesciences.co.jp

e-mailで最新情報をお届けしています。お申込みは上記Webサイト右上の「メール会員登録」から。

©2010 GE ヘルスケア・ジャパン株式会社 本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。
掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。
掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。

GEヘルスケア・ジャパン株式会社
ライフサイエンス統括本部
〒169-0073
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング
お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

ISO 9001:2000認証取得

取扱店